

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

***CORDIA VERBENACEA* DC.: PERFIL MORFO-ANATÔMICO, HISTOQUÍMICO,
FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-*CANDIDA* DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO E SUAS FRAÇÕES**

JUHAN AUGUSTO SCARDELATO PEREIRA

Araraquara – SP
2013

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS
CÂMPUS DE ARARAQUARA

***CORDIA VERBENACEA* DC.: PERFIL MORFO-ANATÔMICO, HISTOQUÍMICO,
FARMACOGNÓSTICO E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTI-CANDIDA DO
EXTRATO HIDROETANÓLICO E SUAS FRAÇÕES**

JUHAN AUGUSTO SCARDELATO PEREIRA

Orientador: Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas, Área de Pesquisa e Desenvolvimento de Fármacos e Medicamentos, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Araraquara – SP
2013

Ficha Catalográfica

Elaborada Pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação
Faculdade de Ciências Farmacêuticas
UNESP – Campus de Araraquara

- P436c Pereira, Juhan Augusto Scardelato
 Cordia verbenacea DC: perfil morfo-anatômico, histoquímico,
 farmacognóstico e avaliação da atividade anti-*Candida* do extrato
 hidroetanólico e suas frações / Juhan Augusto Scardelato Pereira . –
 Araraquara, 2013
 52 f.
- Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de
 Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós
 Graduação em Ciências Farmacêuticas
 Orientador: Luis Vitor Silva do Sacramento
1. *Cordia verbenacea*. 2. Farmacobotânica. 3. Controle de qualidade. 4.
 Fitoquímica. 5. Atividade antifúngica. I. Sacramento, Luis Vitor Silva do,
 orient.. II. Título.

CAPES: 40300005

Dedico este trabalho à minha mãe, Regina, atribuindo-lhe todo meu sucesso, aos ensinamentos morais e intelectuais que me dedicou. Amo-lhe!

Ao meu irmão, Jhansen, pois mesmo com as inúmeras brigas nunca deixou de ser meu melhor amigo e uma das pessoas que sempre contarei para estar ao meu lado.

E aos meus avôs, Luís e Maria, por terem sido como pais para mim; sinto muita sua falta. Muito obrigado por tudo o que fizeram durante o pouco tempo que estivemos juntos.

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Prof. Dr. Luis Vitor Silva do Sacramento, pela orientação incondicional. Não foi apenas orientador acadêmico, mas sim, um orientador para minha vida. Obrigado por acreditar em mim e dado a oportunidade de trabalhar ao seu lado.

Aos professores, Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro e Dr. André Gonzaga dos Santos, pelas orientações durante o desenvolvimento deste trabalho e também na qualificação deste trabalho.

As professoras Tais Maria Bauab e Dulce Helena Siqueira da Silva, pelas considerações na defesa deste trabalho.

A Angélica, que não foi apenas técnica do laboratório, mas também amiga e orientadora; sempre presente e disposta a me ajudar em tudo, tanto no âmbito acadêmico quanto no pessoal, apesar das nossas “guerras” inesquecíveis.

A professora Dra. Hérica Regina Nunes Salgado, pela sua orientação durante o estágio docência que realizei na disciplina de Controle Biológico de Medicamentos.

Ao meu Padrasto, Dirley, por ser a figura masculina que tive em minha vida.

Aos meus amigos da república “Deus Lhe Pague”: Gian, Glauco, Peterson, Ulisses, Timor, Du, Matheus, André, Jim, Friboi, Denis, Jailison e Moab, os quais, não são apenas companheiros de moradia, são amigos que levarei para toda a vida.

A todos os amigos que fiz durante esta etapa de aprendizado. Débora, Camila (Píru), Juninho, Mariana, Marília, Larissa, Margareth, Flávio, Caio, Matheuzinho, Rodrigo, Dudu, Mariana Rozatto, Ana Paula, Fernanda, Alessandra, Isabela e em especial ao Victor Hugo por dedicar parte do seu tempo em me ensinar e instruir durante minha preparação para ingresso no mestrado.

E à CAPES, pela bolsa que me foi concedida.

*"Não tem nada a ver com ser possível ou não,
eu faço porque quero"*

Monkey D. Luffy (One Piece)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	10
2. REVISÃO DA LITEATURA	11
3. OBJETIVOS.....	17
3.1 Objetivo geral	17
3.2 Objetivos específicos	17
4. MATERIAIS E MÉTODOS	18
4.1 Obtenção do material vegetal	18
4.2 Estudo anatômico.....	18
4.3 Estudo histoquímico	19
4.4 Obtenção da droga vegetal	20
4.5 Determinação das características físico-químicas da droga vegetal	20
4.5.1 Análise granulométrica	21
4.5.2 Determinação da densidade aparente da droga vegetal pulverizada	21
4.5.3 Perda por secagem do vegetal fresco	21
4.5.4 Determinação da perda por dessecação.....	22
4.5.5 Determinação do valor pH.....	22
4.5.6 Determinação do teor de cinzas totais	22
4.5.7 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido	22
4.5.7 Determinação do teor de extrativos	23
4.6 Análise fitoquímica preliminar.....	23
4.6.1 Teste de identificação de saponinas.....	23
4.6.2 Teste de identificação de taninos.....	23
4.6.2.1 Reação com solução de gelatina	24
4.6.2.2 Reação com sais de ferro.....	24
4.6.3 Teste de identificação de flavonoides.....	24
4.6.3.1 Reação de Shinoda	24
4.6.3.2 Reação de Taubock	24
4.6.3.3 Reação de Pew	25
4.6.3.4 Reação com cloreto férrico.....	25
4.6.3.5 Reação com cloreto de alumínio.....	25
4.6.4 Testes de identificação de antraquinonas.....	25
4.6.4.1 Antraquinonas livres	25
4.6.4.2 Glicosídeos antraquinônicos (Reação de Borntrager)	25
4.6.5 Testes de identificação de alcaloides.....	25
4.6.6 Testes de identificação de cumarinas.....	26
4.6.7 Testes de identificação de metilxantinas.....	26
4.7 Cromatografia em camada delgada.....	26
4.7.1 Obtenção do extrato e frações	26
4.7.2 Técnicas cromatográficas	27
4.8 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	27
4.8.1 Preparo das amostras.....	28
4.9 Teste de atividade anti- <i>Candida</i>	28
4.9.1 Seleção e cultivo das linhagens de leveduras	28
4.9.2 Preparo das amostras vegetais	28
4.9.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM).....	29
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	31

5.1 Estudo anatômico.....	31
5.2 Estudo histoquímico.....	33
5.3 Determinação das características físico-químicas da droga vegetal	35
5.4 Análise fitoquímica preliminar e cromatografia em camada delgada (CCD)	38
5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE	41
5.6 Determinação da atividade anti- <i>Candida</i>	43
6. CONCLUSÃO	46
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	47

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Imagem de <i>Cordia verbenacea</i> DC. (www.ufrrs.br/fitoecologia/florars).....	13
2	Fórmula estrutural do α -humuleno e da artemitina, respectivamente.....	13
3	Amostra representativa do indivíduo estudado (<i>Cordia verbenacea</i> DC.) prensado e seco para composição da exsicata.....	18
4	Esquema da técnica de diluição em microplacas.....	30
5	Fotomicrografias do aspecto anatômicos de Folhas de <i>Cordia verbenacea</i> . A: Região da nervura central; B: nervura central com destaque para distribuição do xilema e floema; C: nervura central, com detalhe do colênquima; D: tricoma tector; E: tricoma glandular; F: estômatos anomocíticos; G: Região do mesofilo; H: região do mesofilo com destaque para os feixes vasculares secundários; I, J, K e L: Idioblastos contendo areia cristalina presentes no mesofilo e no parênquima fundamental. Escala: 100 μ m	32
6	Fotomicrografia apresentando os resultados positivos dos testes histoquímicos realizados em folhas de <i>Cordia verbenacea</i> . A: controle, B e D: Compostos fenólicos, C: Flavonoides, E: Pectinas, F: Lipídios totais, G: óleos essenciais e H: Terpenoides com grupo carbonila. Escala: 100 μ m.....	34
7	Distribuição do tamanho das partículas da droga vegetal obtida das partes aéreas de <i>Cordia verbenacea</i>	37
8	Determinação da presença e ausência de metabólitos secundários em <i>Cordia verbenacea</i> por cromatografia em camada delgada. Distribuição na placa: extrato bruto/fração aquosa/n-butanol/hexano/acetato de etila. A: Ausência de Alcaloides, revelador Dragendorff e fase móvel Cloroformio/acetato de etila (60:40); B: Presença de flavonoides no extrato bruto e fração n-butanol, revelador NP-PEG e fase móvel N-butanol/ácido acético/água (60:37:3); C: Presença de terpenos na fração hexano, revelador anisalaldeído sulfúrico e fase móvel Hexano/acetato de etila/isopropanol (70:28:2).....	40
9	Determinação da presença de metabólitos secundários em <i>Cordia verbenacea</i> por cromatografia em camada delgada. Distribuição na placa: extrato bruto/fração aquosa/n-butanol/hexano/acetato de etila. A: Presença de taninos no extrato bruto e frações aquosa, n-butanol e acetato de etila, revelador solução etanólica de FeCl ₃ 1% e fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/água (80:10:10); B: Presença de taninos no extrato bruto e frações aquosa, n-butanol e acetato de etila, revelador solução etanólica de FeCl ₃ 1% e fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5).....	41
10	Cromatogramas do extrato bruto de <i>Cordia verbenacea</i> e suas frações utilizando CLAE. A: Extrato bruto; B: Fração n-butanol; C: Fração aquosa; D: Fração Acetato de etila; E: Fração hexano.....	42
10a	Cromatogramas do extrato bruto de <i>Cordia verbenacea</i> e suas frações utilizando CLAE. D: Fração Acetato de etila; E: Fração hexano.....	43

LISTA DE TABELAS

Tabela		Página
1	Fases móveis e reveladores utilizados na identificação de metabólitos secundários utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada.....	27
2	Perfil histoquímico da espécie <i>Cordia verbenacea</i>	33
3	Parâmetros físico-químicos de qualidade da droga vegetal obtida a partir das partes aéreas de <i>Cordia verbenacea</i>	35
4	Resultados referentes à triagem fitoquímica preliminar da droga vegetal pulverizada das partes aéreas de <i>Cordia verbenacea</i>	38
5	Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) (μ g mL ⁻¹) do extrato bruto de <i>Cordia verbenacea</i> e suas frações.....	44

RESUMO

Cordia verbenacea DC. pertence à família Boraginaceae que contém aproximadamente 100 gêneros, com mais de 2000 espécies distribuídas em todo o planeta. Ocorre ao longo de todo litoral brasileiro, sendo considerada, também, uma planta comum na Floresta Tropical Atlântica, possuindo vários nomes populares como maria-preta, maria-milagrosa e catinga-de-barão, sendo o mais comum erva-baleeira, ou simplesmente baleeira. É amplamente utilizada para tratar processos inflamatórios sendo geralmente aplicada topicamente nas áreas atingidas. Foi utilizada pelo laboratório Aché para o desenvolvimento do Acheflan[®], primeiro medicamento fitoterápico 100% nacional com registro na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), utilizado para o tratamento de tendinites crônicas e dores miofaciais. Este trabalho objetivou: traçar um perfil físico-químico da droga vegetal oriunda das partes aéreas de *Cordia verbenacea*; realizar um estudo anatômico e histoquímico do limbo; realizar um estudo fitoquímico preliminar traçando um perfil do extrato bruto e de suas frações, bem como verificar seus respectivos potenciais anti-*Candida*. Tricomas tectores e glandulares, estômatos anomocíticos e idioblastos contendo areia cristalina destacam-se como marcadores anatômicos. O estudo histoquímico revelou a ocorrência de lipídios totais, óleos essenciais, terpenoides com grupo carbonila, compostos fenólicos, flavonoides e pectinas. A droga vegetal estudada apresentou resultados favoráveis ao estabelecimento de parâmetros físico-químicos, tais como, perda por dessecação (8,40%), cinzas totais (17,40%) e cinzas insolúveis em ácido (1,02%), com perfil fitoquímico preliminar apontando ocorrência de saponinas, flavonoides, alcaloides, terpenos e taninos. O estudo em CCD foi confirmativo para flavonoides, terpenos e taninos. O extrato bruto e suas frações (aquosa, hexano, n-butanol e acetato de etila) apresentaram resultados interessantes quando comparados com os resultados do óleo essencial de *Cordia verbenaceae* encontrados na literatura. As concentrações inibitória mínima variaram contra cepas de *Candida albicans* (1250 a >2500 µg mL⁻¹), *C. krusei* (312,5 a 625 µg mL⁻¹), *C. parapsilosis* (625 a 2500 µg mL⁻¹), *C. glabrata* (9,77 a 36,06 µg mL⁻¹) e *C. tropicalis* (312,5 a 625 µg mL⁻¹). Ampliando assim os estudos não apenas focados no óleo essencial, mas também na produção de extratos.

Palavras-chave: *Cordia verbenacea*, farmacobotânica, controle de qualidade, fitoquímica, atividade antifúngica

ABSTRACT

Cordia verbenacea DC. belongs to the Boraginaceae family, which contains approximately 100 genera and over 2000 species distributed across the planet. This species occurs all along the Brazilian coast, and it's also considered a common plant in the Atlantic Rainforest, having many popular names like maria-preta, maria-milagrosa e catinga-de-barão, the most common erva-baleeira, or simply baleeira. It is widely used to treat inflammatory processes and it's usually applied topically on the affected areas. It was used by the Aché laboratories for the development of Acheflan[®], it was the first national herbal medicine registered in the Brazilian Regulatory Agency for Sanitary Surveillance (ANVISA), indicated for the treatment of chronic tendinitis and myofascial pain. The aim of this work is to obtain a physical-chemical profile of the plant drug derived from branches of *Cordia verbenacea*; develop a morphological and histochemical study of limbo; develop a preliminary phytochemical study outlining a profile of the crude extract and its fractions, as well as checking their anti-*Candida* potential. Tector trichomes, glandular trichomes, anomocytic stomata and idioblasts with crystal sands stand out as anatomical markers. The histochemical study revealed the occurrence of lipids, essential oils, terpenoids with the carbonyl group, phenolic compounds, flavonoids and pectins. The drug studied showed favorable results to the establishment of physico-chemical parameters, such as loss on drying (8.40%), total ash (17.40%) and acid insoluble ash (1.02%), and a preliminary phytochemical profile that points occurrence of saponins, flavonoids, alkaloids, terpenes and tannins. The CCD study was confirmatory for flavonoids, terpenes and tannins. The crude extract and its fractions (aqueous, hexane, n-butanol and ethyl acetate) showed interesting results when compared with the results of the essential oil of *Cordia verbenaceae* literature. The minimum inhibitory concentrations ranged against strains of *Candida albicans* (1250 - >2500 µg mL⁻¹), *C. krusei* (312.5 - 625 µg mL⁻¹), *C. parapsilosis* (625 - 2500 µg mL⁻¹), *C. glabrata* (9.77 - 36.06 µg mL⁻¹) and *C. tropicalis* (312.5 - 625 µg mL⁻¹). Thus extending the studies not only focused on the essential oil, but also in the production of extracts.

Keywords: *Cordia verbenacea*, pharmacobotany, quality control, phytochemical, antifungal activity

1. INTRODUÇÃO

Desde os tempos mais remotos, as plantas sempre estiveram ligadas ao cotidiano do homem, servindo como alimento e como remédios aos seus males (BENDAZZOLI, 2000). Estudos da década de 90 realizados pela Organização Mundial da Saúde, mostravam que de 65-80% da população dos países em desenvolvimento tinham nas plantas medicinais a única fonte de acesso aos cuidados à saúde (AKERELE, 1993). No Brasil as plantas medicinais são consumidas com pouca ou nenhuma comprovação farmacológica. Muitas vezes estas plantas são utilizadas para fins medicinais diferentes daqueles usuais (VEIGA-JÚNIOR & PINTO, 2005).

A droga vegetal a ser utilizada deve corresponder a um material de qualidade seguro e eficaz. Para tanto, realiza-se a caracterização da matéria-prima vegetal por meio de técnicas físico-química. Diversos estudos avaliam as características da planta medicinal de modo a contribuir para um consenso quanto aos parâmetros e perfis de qualidade. Além disso, a presença dos metabólitos secundários responsáveis pela atividade deve ser averiguada. Quando não se tem conhecimento de quais são esses metabólitos, deve-se realizar uma triagem fitoquímica preliminar, podendo-se determinar quais classes de metabólitos estão presentes, como alcaloides, flavonoides, taninos, antraquinonas, saponinas, dentre outros.

Devido à vários estudos do potencial do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, e a um número reduzido de estudos fitoquímicos com não voláteis, o presente estudo teve como objetivo, realizar uma análise farmacognóstica da droga vegetal, com isso proporcionar dados que sirvam como apoio para futuras pesquisas, a fim de fornecer informações sobre os parâmetros analisados, para que estes possam servir como referência para o controle de qualidade desta espécie, como matéria-prima vegetal, para a produção de fitoterápicos.

Também, a busca de plantas medicinais como fonte de princípios ativos antimicrobianos ocupa um grande grupo de pesquisas, visto que a ocorrência de cepas resistentes aos antimicrobianos existentes tem se tornado preocupante.

Cordia verbenacea foi estudado quanto à atividade de seu óleo essencial, se destacando contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (PINHO et al., 2011; Rodrigues et al., 2012). Contudo, pouco se conhece a respeito de seus extratos frente aos fungos. Desta forma, foi realizado um estudo para o potencial da atividade anti-*Candida* do extrato bruto e suas frações (aquoso, n-butanol, acetato de etila e hexano).

2. REVISÃO DA LITERATURA

As plantas medicinais constituem importantes recursos terapêuticos para tratamentos de doenças. Servem tanto à conhecida “medicina caseira”, que faz parte da cultura popular, como de matéria-prima para elaboração de medicamentos fitoterápicos ou extração de compostos químicos com atividade terapêutica. A fitoterapia existe principalmente no mercado informal, o que representa grande perigo à saúde da população, pois neste caso, sua comercialização ocorre desconsiderando os aspectos relativos ao controle de identidade e/ou pureza (CORDEIRO et al., 2006).

São considerados medicamentos fitoterápicos os obtidos com emprego exclusivo de matérias-primas ativas vegetais, os quais a eficácia e segurança são validadas através de levantamentos etnofarmacológicos, utilização, documentos tecnocientíficos ou evidências clínicas. Os fitoterápicos são caracterizados pelo conhecimento da eficácia e dos riscos de seu uso, bem como pela reprodutibilidade e constância de qualidade conforme a RDC 14/2010 da ANVISA (ANVISA, 2010). É indiscutível a necessidade de um maior e melhor controle nesse ramo farmacêutico, pois os fitoterápicos representam uma alternativa economicamente viável à população (BENDAZZOLI, 2000).

O uso correto para fins terapêuticos requer o uso de plantas medicinais selecionadas por sua eficácia e segurança terapêuticas. A toxicidade de medicamentos preparados com plantas pode parecer pequena, porém, quando comparada com os medicamentos de origem sintética, se torna um problema preocupante à saúde pública (BALBINO, 2010).

Inúmeras espécies são amplamente usadas pela população, algumas possuem estudos químicos e/ou farmacológicos que oferecem suporte para a sua utilização, outras são empregadas baseadas apenas em conhecimento empírico ou tradicional. (SIMÕES et al., 2010).

A validação de novas drogas vegetais através da pesquisa seria o caminho para obtenção de um melhor aproveitamento das plantas medicinais e seus derivados aplicados à fitoterapia (LORENZI, 2008). Uma tendência que se destaca, devido ao aumento na procura por parte da população de produtos funcionais baseados em princípios ativos vegetais, desta forma, muitas empresas estão conscientes das tendências deste tipo de consumo e buscam novos ingredientes para incorporar aos produtos já existentes e aos que serão desenvolvidos no futuro (HUBINGER et al., 2009), como no

caso de agentes antimicrobianos, que estão sempre em estudos devido a varias espécies de micro-organismos e a sua crescente resistência contra os antimicrobianos no mercado.

Como no caso da família *Boraginaceae*, a qual, se encontram estudos de atividade antimicrobiana em várias de suas espécies, como por exemplo a *Cordia globosa* que em estudo desenvolvido por Zavaleta et al. (2011) apresentou atividade contra bactérias gram positivas com a concentração inibitória mínima variando de 125 a 1.000 µg/mL .

A família *Boraginaceae* contém aproximadamente 100 gêneros, com mais de 2000 espécies distribuídas em todo planeta. Seus maiores centros são as regiões do mediterrâneo e nos Estados Unidos. No Brasil, é representada por poucos gêneros (BARROSO et al., 2002). Insetos e animais herbívoros consomem estas espécies podendo levar a teoria de que elas podem ser isentas de toxicidade, ressaltando a diferença entre os organismos desses animais e o organismo humano (JORGE et al., 1998).

Dentre as várias espécies desta família as tipicamente brasileiras são a *Cordia corymbosa* G. Don, utilizada no tratamento de feridas, *Cordia curassavica* Auct. Ex Fresen, com propriedades antifúngicas, larvicida e usada no tratamento de resfriados, dores de cabeça, doenças parasitárias e de pele, *Cordia salicifolia* Cham, contém atividade antiviral, diurética e útil no tratamento da obesidade e *Cordia verbenacea* DC., anti-inflamatória, anti-ulcera e anti-reumático e cicatrizante (BARROSO et al., 2002).

Cordia verbenacea DC. (Figura 1), também nomeada como *Cordia salicina*, *Cordia curassavica*, *Cordia cylindristachia*, *Lithocardium fresenii*, *Lithocardium salicinum* e *Lithocardium verbaceum* (DE CARVALHO JR et al., 2004), é uma planta arbustiva, perene, com folhas vigorosas, sem brilho e superfície crespas, suas flores são pequenas, de corolas brancas e reunidas em inflorescências escorpióides e vistosas, as partes aéreas apresentam forte odor facilmente desprendido pelo manuseio (LORENZI & MATOS, 2002). Ocorre ao longo de todo litoral brasileiro comumente encontrada no trecho compreendido entre os Estados de Santa Catarina, Paraná e São Paulo, sendo considerada, também, uma planta comum na Floresta Tropical Atlântica, possuindo vários nomes populares como maria-preta, maria-milagrosa e catinga-de-barão, sendo o mais comum erva-baleeira, ou simplesmente baleeira (LADEIRA, 2002).



Figura 1: Imagem de *Cordia verbenacea* DC. (www.ufrgs.br/fitoecologia/florars)

As preparações populares (tradicionais/garrafas) empregando soluções hidroetanólicas de *Cordia verbenacea* (partes aéreas) são amplamente utilizadas para tratar vários processos inflamatórios e são geralmente aplicadas topicamente nas áreas atingidas. Também são indicadas para artrites, reumatismos e problemas de coluna (PINTO et al., 2009). Os princípios ativos já identificados compreendem atualmente componentes do óleo essencial, com seu principal componente sendo o α -humuleno e os flavonóides, principalmente a artemitina (Figura 2) (MATIAS et al., 2010).

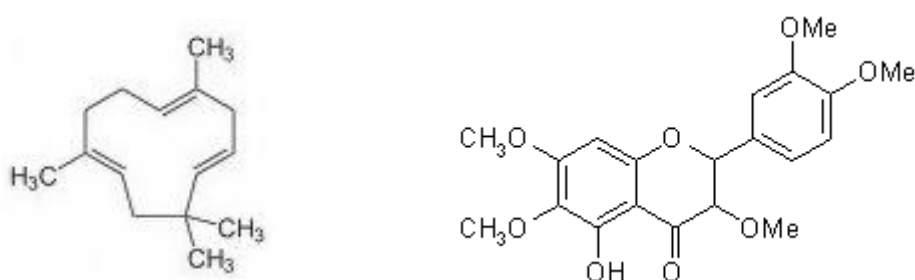


Figura 2: Fórmula estrutural do α -humuleno e da artemitina, respectivamente.

Sertié et al. (1988), relatou que o extrato hidroalcoólico liofilizado de folhas de *C. verbenacea* apresentou atividade anti-inflamatória, aliada a um efeito protetor da mucosa gástrica e uma toxicidade muito baixa (DL50 (DL50 = 131,6 mg kg⁻¹), sendo 100 vezes maior do que a DE50 (DE50 = 1,24 mg kg⁻¹) quando administrado por via oral em camundongos.

Estudos fitoquímicos realizados com *Cordia verbenacea* identificaram a presença de monoterpenos, sesquiterpenos (DE CARVALHO JR. et al., 2004), triterpenos (VELDE et al., 1982) e flavonas (VELDE et al., 1982; LINS et al., 1990). Já seu óleo essencial tem o α -pineno como constituinte principal (29,69%), *trans*-cariofileno (25,27%), aloaromadendreno (9,99%) e α -humuleno (4,64%) (DE CARVALHO JR. et al., 2004).

Assim, o Laboratório Farmacêutico Aché, considerando o conhecimento etnofarmacológico da *Cordia verbenacea*, desenvolveu o Acheflan[®], anti-inflamatório fitoterápico indicado para tratar tendinite crônica e dores miofaciais, o qual tornou-se conhecido por ter sido o primeiro medicamento fitoterápico desenvolvido com tecnologia 100% nacional. O produto é apresentado nas formas farmacêuticas de aerosol e de creme, cada uma contendo 5,0 mg do óleo essencial de erva-baleeira (*Cordia verbenacea*), padronizado em 2,3-2,9% do monoterpeno α -humuleno. Entrou no mercado em junho de 2005 (COUTINHO, 2009; SANTOS & PINHO, 2010). Além disso, a *Cordia verbenacea* faz parte da lista composta por 71 plantas com potencial terapêutico indicadas pelo SUS (Sistema único de Saúde) para estudos e posteriormente serem liberadas para consumo da população (BRASIL, 2006).

Em estudos de atividade antimicrobiana, propõe-se que metabólitos secundários como o caso dos flavonoides apresentam boa atividade antifúngica, assim como taninos, terpenoides e alcaloides (ARIF et al., 2009; COWAN, 1999). Scalbert (2001) propõe para explicar a atividade antimicrobiana dos taninos, a inibição das enzimas extracelulares, privação dos substratos necessários para o crescimento microbiano ou ação direta sobre o metabolismo microbiano através da fosforilação oxidativa.

Estudos demonstram que *Cordia verbenacea* apresenta flavonoides como um de seus ativos terapêuticos (MATIAS et al., 2010), de modo que em estudos possam vir a apresentar atividade antifúngica. Ela já foi estudada quanto à sua ação antibacteriana por Rodrigues et al. (2012) se destacando no combate *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* com CIMs 64µg ml⁻¹ utilizando seu óleo essencial, também apresentou uma considerável atividade fungistática contra *Candida albicans* e *Candida*

krusei com CIMs de 512µg ml⁻¹.

A candidíase expressa variedade de relações que ocorrem entre hospedeiro e microbiota autóctone, isto é, do comensalismo à doença sistêmica fatal. O gênero *Candida* é responsável pela colonização, por infecções fúngicas superficiais em imunocompetentes e por infecções sistêmicas em imunodeprimidos, tais como os portadores do vírus da AIDS e em pacientes transplantados como descrito no estudo realizado por Neto et al. (1997) que verificou episódios de candidíase em pacientes que realizaram transplantes renais nos quais os agentes mais freqüentes encontrados foram *Candida albicans*, seguida de *C. tropicalis* e *C. glabrata*. A variedade de apresentações da doença leva à necessidade de utilização de diferentes métodos de diagnósticos e esquemas terapêuticos.

Leveduras do gênero *Candida* são comumente encontradas no homem e em outras espécies de animais, podendo também fazer parte da microbiota normal dos seres humanos (ANAISSIE & ANDERSON, 1992), pois se trata de um patógeno comumente encontrado. Pode ser encontrada principalmente na orofaringe, no trato gastrointestinal e na vagina e, quando ocorre desequilíbrio, pode causar uma infecção fúngica: a candidíase. Contudo, *Candida tropicalis*, *Candida krusei*, *Candida parapsilosis* e *Candida guilliermondii* são encontradas com menor frequência (CROCCO et al., 2004).

Além da candidíase oral que é a infecção oportunista mais comum em pacientes imunocomprometidos, tendo a clorexidina utilizada como auxílio em seu tratamento, os azóis (fluconazol e o cetoconazol) como importantes antimicrobiano auxiliares no seu tratamento se faz uso também de anfotericina B (MACHADO et al., 2010). A candidíase vaginal afeta muitas mulheres em idade adulta, estima-se que aproximadamente 75% destas tenham pelo menos um episódio de vulvovaginite fúngica durante sua vida, das quais, 40 a 50% vivenciam novos surtos. A espécie isolada mais frequente de secreções vaginais continua sendo *Candida albicans*, que durante muito tempo se acreditava que era a única capaz de produzir doenças no homem, contudo, outras espécies também estão envolvidas neste tipo de infecção (ALVES et al., 2010). Sobel et al. (1998) demonstraram que a prevalência de vaginite fúngica causada por espécies não-*albicans* cresceu de 9,9%, em 1988, para 17,2% em 1995, a razão desse aumento é atribuída ao uso inadequado de antifúngicos.

Na América Latina a distribuição das espécies de *Candida* isoladas de infecção da corrente sanguínea corresponde a 46,6% *C. albicans*, 21,3% *C. tropicalis*, 17,1% *C. parapsilosis* e 3,6% *C. krusei* (PFALLEAR & DIEKEMA, 2004; DIEKEMA et al.,

2009). Assim, muitas espécies não *albicans* mais comumente isoladas são menos sensíveis aos derivados azólicos, dificultando o tratamento dessas infecções. Embora a sensibilidade do gênero *Candida* aos antifúngicos disponíveis seja variável e previsível, nem sempre uma determinada amostra isolada segue o padrão geral (CROCCO et al., 2004).

Essa é uma das razões da crescente importância de novos testes de susceptibilidade para se descobrir novos agentes antifúngicos, devido ao aumento da resistência das várias espécies fúngicas aos antifúngicos atuais e ao número crescente de contaminação por espécies não-*albicans* afetando uma grande parte da população.

3. OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

- Contribuir para o perfil farmacognóstico de *Cordia verbenacea* DC. e executar testes de atividade antimicrobiana do extrato bruto e suas frações obtidos de suas partes aéreas.

3.2 Objetivos específicos

- Caracterizar anatômica e histoquimicamente o limbo foliar;
- Realizar testes de caracterização físico-química da droga vegetal originada das partes aéreas;
- Traçar o perfil cromatográfico do extrato bruto e suas frações (aquosa, n-butanol, acetato de etila e hexano);
- Verificar a atividade anti-*Candida* do extrato bruto e suas frações (aquosa, n-butanol, acetato de etila e hexano);

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Obtenção do material vegetal

Partes aéreas de *Cordia verbenacea* DC. foram coletadas da coleção de plantas medicinais, localizada no campo experimental do CPQBA – Unicamp, no Distrito de Betel – Paulínia, SP (22°47'15.91"S 47°06'42.87"O). As folhas frescas foram destinadas às análises anatômicas e histoquímicas. Também foram coletados exemplares destinados à preparação de exsicatas (Figura 3), as quais foram enviadas para tombamento no Herbário São José do Rio Preto (Ibilce/Unesp) sob o número 31235.



Figura 3: Amostra representativa do indivíduo estudado (*Cordia verbenacea* DC.) prensado e seco para composição da exsicata.

4.2 Estudo anatômico

Visando à análise anatômica, o limbo de folhas de *Cordia verbenacea* DC. foi dividido em três segmentos, sendo utilizados apenas os terços medianos. Para tanto, uma

subamostra de 9mm² foi tomada e fixada em solução de glutaraldeído (2,5%) e formaldeído (4%), por imersão, durante 12 horas, em condição de vácuo e temperatura ambiente.

Posteriormente, o material foi submetido a uma pré-infiltração e à infiltração para polimerização em resina sintética glicol metacrilato, segundo Kraus & Arduin (1997), seguindo as especificações do fabricante da resina (Leica[®]).

Após a inclusão, o material vegetal foi seccionado em micrótomo, visando obter secções de 7µm de espessura. Seguiu-se, então, à aderência das secções em lâminas de vidro e coloração com azul de toluidina 0,05% em tampão fosfato pH 6,8 (KRAUS & ARDUIN, 1997). Os cortes em seguida foram submetidos à secagem em estufa a 37°C e na sequência montados em resina Permount[®]. O estudo anatômico das lâminas foi realizado em microscópio fotônico (Zeiss[®]) sendo as imagens registradas em sistema de captura acoplado. Também foram realizados cortes paradérmicos do limbo foliar para visualização dos estômatos.

4.3 Estudo histoquímico

Para a realização dos testes histoquímicos, folhas foram submetidas a cortes transversais à mão e, segundo os procedimentos propostos por Ascensão (2003), foram testados quanto a ocorrência de compostos polares e apolares. Em seguida, os cortes foram analisados e as imagens registradas em microscópio acoplado a sistema de captura de imagens.

Quanto ao estudo das substâncias apolares, foram utilizados os seguintes reagentes: Sudan III (JOHANSEN, 1940) para lipídios totais; sulfato azul do Nilo (CAIN, 1947) para diferenciação de lipídios ácidos e neutros; reagente de NADI (DAVID & CARDE, 1964) para identificação de óleos essenciais e oleoresinas; tricloreto de antimônio (HARDMAN & SOFOWORA, 1972; MACE & HOWELL, 1974) para identificação de esteroides; ácido sulfúrico para a identificação de lactonas sesquiterpênicas (GEISSMAN & GRIFFIN, 1971) e 2,4-dinitrofenilhidrazina (GANTER & JOLLÉS, 1969-1970) para identificação de terpenoides com grupo carbonila.

Já em relação aos compostos polares, foram utilizados os seguintes reagentes: cloreto férrico (JOHANSEN, 1940) para a identificação de compostos fenólicos totais; ácido clorídrico para identificação de flavonoides, vanilina clorídrica (MACE & HOWELL, 1974) para a identificação de taninos, reagente de Dragendorff

(SVENDSEN & VERPOORTE, 1983) para identificação de alcaloides; lugol (JENSEN, 1962) para a identificação de amido; vermelho de rutênio (JOHANSEN, 1940) para identificar pectinas e azul brilhante de Comassie (FISCHER, 1968) para identificar proteínas totais.

Para a identificação de lactonas sesquiterpênicas foi utilizado o método de Geissman & Griffin (1971), modificado por Higuchi (2007). Sendo assim, foi utilizada uma solução de ácido sulfúrico:glicerina (1:1), ao invés de ácido sulfúrico concentrado, de modo a permitir melhor visualização dos resultados em virtude da preservação das estruturas celulares por mais tempo.

Em estudos histoquímicos empregados na detecção de metabólitos celulares verificam-se em alguns casos, reações positivas para mais de uma substância (conforme o reagente utilizado), daí a necessidade de testes complementares e da utilização de controles para a garantia da correta interpretação. Em virtude desta recomendação, foram realizadas três repetições para cada teste, sendo necessários testes complementares quando os compostos forem determinados por apenas um tipo de reação de coloração.

Assim, os controles negativos utilizados para avaliação de substâncias apolares foram obtidos seguindo-se as recomendações de Lewinsohn et al. (1998) da seguinte forma: os cortes foram submetidos a passagens de 10 minutos pela série etanólica 25%, 50%, 75% e 100% e cetônica (50% em etanol e 100%), seguida de reidratação gradual. Em relação aos compostos polares, os cortes foram submetidos a tratamentos de 15 minutos em solução de hipoclorito de sódio comercial (máximo de 2% de cloro ativo), seguidos de 3 banhos consecutivos em solução de ácido acético:água destilada (1:500).

4.4 Obtenção da droga vegetal

Partes aéreas (folhas, caules, flores e frutos) de *Cordia verbenaceae* DC. foram coletadas e lavadas em solução de hipoclorito de sódio (0,2%) e água destilada. A seguir, o excesso de água foi removido e as partes aéreas foram conduzidas à secagem em estufa de circulação de ar a 40°C até massa constante. Seguiu-se uma trituração das partes aéreas secas em moinho de facas.

4.5 Determinação das características físico-químicas da droga vegetal

Para a caracterização da droga vegetal quanto aos seus parâmetros físico-

químicos foram desenvolvidos segundo metodologias farmacopeicas [utilizando-se como referências: Farmacopéia Brasileira (1988); Farmacopéia Brasileira (1996); Farmacopéia Brasileira (2000); Farmacopéia Brasileira (2010); The United States Pharmacopeia (2003)], e outras não farmacopéicas, descritas por Harbone (1998); Ansel et. al. (2000); Costa (2001) e Aulton (2005). Todos os testes foram realizados em triplicata.

4.5.1 Análise granulométrica

Visando à padronização da droga vegetal, foi determinado o tamanho médio da partícula da droga vegetal, utilizando-se a passagem de 25,0g do pó por uma sequência de tamises com abertura de malhas diferentes, correspondentes a 1,000; 0,850; 0,425; 0,180; 0,125; 0,062 mm com tampa e recipiente coletor, utilizando tamisador vibratório na escala de 100 vibrações/minuto, durante 30 minutos. A quantidade de pó remanescente em cada tamis e no coletor foi determinada e o tamanho médio de partícula foi calculado de acordo com a equação sugerida por Ansel et al. (2000).

$$TMP = \sum \frac{(retida) \times (abertura \text{ média})}{100}$$

4.5.2 Determinação da densidade aparente da droga vegetal pulverizada

Foram amostrados 50g da droga vegetal (AMOSTRAGEM, 1988) e colocados em encapsulador contendo 25 cápsulas tamanho 0, as quais tiveram suas massas medidas (vazias e cheias), sendo que a subtração entre esses valores é correspondente à massa de droga vegetal. Sendo assim, a densidade aparente de cada droga foi determinada pela relação massa de droga/volume (MARTINS & SACRAMENTO, 2004). O volume das 25 cápsulas é de 17mL.

4.5.3 Perda por secagem do vegetal fresco

Três amostras de 10g de folha fresca da espécie vegetal foi colocada em estufa com circulação de ar a 40°C. A massa foi medida diariamente até obtenção de valores constantes. Os resultados foram expressos em porcentagem, sendo referentes à quantidade de água perdida durante o processo de secagem (DETERMINAÇÃO, 1997).

4.5.4 Determinação da perda por dessecação

Colocou-se 10g da droga pulverizada em uma cápsula, com a massa previamente determinada, foi colocada em estufa a 105°C por 5 horas, sendo, após arrefecimento, pesada. Seguir-se-á a dessecação, avaliando-se a massa a cada 1 hora, até massa constante. A seguir, a perda por dessecação pode ser determinada pela equação proposta pela Farmacopéia Brasileira:

$$\frac{Pu - Ps}{Pa} \times 100$$

Onde:

Pa: massa da amostra;

Pu: massa da cápsula contendo a amostra antes da dessecação;

Ps: massa da cápsula contendo a amostra após a dessecação.

4.5.5 Determinação do valor pH

Sobre 1,0g de droga vegetal, originada das partes aéreas, foi vertido 99,0g de água em ebulição, deixando-se repousar por 15 minutos. A seguir, o líquido extrativo foi filtrado e após esfriar, o pH foi medido com peagômetro previamente calibrado. Para maior reprodutibilidade, foi também determinado o pH da água utilizada para obtenção da solução extrativa .

4.5.6 Determinação do teor de cinzas totais

Cadinhos de porcelana foram calcinados em mufla a 450°C e deixados para resfriar em um dissecador por 15 minutos. A seguir, sua massa foi determinada. 3,0g de pó da drogas vegetal, originada das partes aéreas, foram pesados e colocados nos cadinhos, sendo levados para mufla a 450°C por 2 horas. Retirou-se, então, os cadinhos da mufla e deixaram-se resfriar em dissecador por 15 minutos, seguindo-se determinação da massa até valor constante. Os resultados foram expressos em porcentagem, indicando o resíduo de cinzas remanescentes no cadinho.

4.5.7 Determinação do teor de cinzas insolúveis em ácido

As cinzas obtidas previamente no ensaio de cinzas insolúveis em ácido foram aquecidas durante 5 minutos com 25mL de ácido clorídrico 10% (p/v) e posteriormente foi completado o volume para 100mL com água destilada. Filtrou-se a solução obtida em papel filtro isento de cinzas e o resíduo foi lavado com água quente até o filtrado

sair límpido. O papel de filtro foi colocado no cadinho e levado à mufla para incineração a 800°C até peso constante. Os resultados representaram a porcentagem de cinzas insolúveis em relação à massa inicial de droga vegetal.

4.5.7 Determinação do teor de extrativos

Foram colocados 4,0g de droga em balão de fundo chato, ao qual foi adicionado, ainda, 100mL de água. A seguir, mediu-se a massa do sistema balão – droga – água. Posteriormente, o balão foi deixado em repouso por 1 hora. Então, o balão foi acoplado a um sistema de refluxo, no qual foi aquecido por mais 1 hora. Completou-se a massa do sistema com o líquido solvente, filtrando-se em seguida. 25mL do filtrado foi evaporado em banho-maria e colocado em estufa a 105°C para total secagem. Pesou-se o resíduo obtido e o teor de extrativos foi determinado em porcentagem (WHO, 2001).

4.6 Análise fitoquímica preliminar

O objetivo das análises fitoquímicas foi identificar os principais grupos de metabólitos secundários presentes na droga vegetal, originada de partes aéreas, de modo a direcionar os estudos subsequentes como a cromatografia em camada delgada descrita no item 4.7.

Foram realizados testes para identificação dos grupos de metabólitos secundários indicados pelos testes histoquímicos presentes na espécie em estudo, segundo a metodologia adaptada de Costa (2001).

4.6.1 Teste de identificação de saponinas

Durante 10 minutos, ferveu-se 2,0g da droga vegetal com 10mL de água destilada. Após resfriar filtrou-se a solução resultante para um tubo de ensaio, o qual foi agitado vigorosamente durante 15 segundos. A ocorrência de espuma e sua permanência durante 15 minutos foi considerado resultado positivo.

4.6.2 Testes de identificação de taninos

Durante 15 minutos, ferveu-se 5,0g da droga vegetal com 100mL de água destilada. A solução foi filtrada e, após arrefecimento foi armazenada para a realização dos seguintes de identificação.

4.6.2.1 Reação com solução de gelatina

Tomaram-se 2mL da solução obtida em 4.6.2 em tubo de ensaio. Foram acrescentadas 2 gotas de HCl diluído e, em seguida, solução de gelatina 2,5% gota a gota. Formação de precipitado indica reação positiva.

4.6.2.2 Reação com sais de ferro

Tomaram-se 2mL da solução obtida em 4.6.2 em tubo de ensaio, e foram acrescentados 10mL de água destilada e, 2 a 4 gotas de solução de FeCl_3 a 1% em metanol. Formação de cor azul indica a presença de taninos hidrolisáveis e de cor verde presença de taninos condensados.

4.6.3 Testes de identificação de flavonoides

Em um béquer de vidro foram tomados 3,0g da droga vegetal e adicionaram-se 20mL de éter de petróleo e, em seguida agitou-se durante 10 minutos com aquecimento brando em banho-maria. Filtrou-se a quente com papel de filtro que após secagem apresentou pó residual, o qual foi colocado em outro béquer e, foram adicionados 30mL de metanol, aquecendo-se novamente em banho-maria por 20 minutos. Procedeu-se nova filtração com recolhimento do filtrado em béquer. Evaporou-se o filtrado até secura e adicionaram-se 10mL de etanol, obtendo-se o extrato final.

4.6.3.1 Reação de Shinoda

Colocou-se 1mL do extrato em tubo de ensaio, adicionando-se um fragmento de magnésio metálico e gotas de ácido clorídrico concentrado. O resultado positivo é constatado após o desprendimento de hidrogênio e o aparecimento de coloração rósea ou vermelha.

4.6.3.2 Reação de Taubock

Evaporou-se em banho-maria 3mL do extrato final até secura. O resíduo foi resfriado e umedecido com 5 gotas de acetona. Adicionou-se alguns cristais de ácido bórico e ácido oxálico. Evaporou-se novamente em banho-maria até secura evitando aquecimento prolongado. Dissolveu-se o resíduo em 5mL de éter etílico e observou-se sob luz Ultravioleta (λ 365nm). Em caso positivo aparecerá fluorescência amarelo esverdeada.

4.6.3.3 Reação de Pew

Evaporou-se em banho-maria 3mL do extrato final em tubo de ensaio até a secura. Ao resíduo adicionou-se 3mL de metanol e uma pequena porção de zinco metálico. Colocou-se aproximadamente 3 gotas de ácido clorídrico concentrado. Em caso positivo aparecerá coloração vermelha.

4.6.3.4 Reação com cloreto férrico

Adicionou-se a 1mL do extrato final algumas gotas de solução metanólica de cloreto férrico (FeCl_3) a 2%. Em caso positivo aparecerá coloração verde, amarela ou violácea dependendo do tipo de flavonoide.

4.6.3.5 Reação com cloreto de alumínio

Umedeceu-se áreas diferentes de papel de filtro com o extrato final. Colocou-se sobre uma das manchas uma gota de cloreto de alumínio a 5% em etanol. O resultado positivo é indicado por fluorescência sob luz Ultravioleta (λ 365nm).

4.6.4 Testes de identificação de Antraquinonas

4.6.4.1 Antraquinonas livres

Agitou-se 1g da droga vegetal com 10mL de éter etílico. À solução etérea adicionou-se 1mL de amônia diluída e agitou-se. Acamada aquosa em caso positivo deverá tornar-se rósea.

4.6.4.2 Glicosídeos antraquinônicos (Reação de Borntrager)

Ao pó residual do teste de atraquinonas livres, seco, adicionou-se 20mL de água e ferveu-se por 5 minutos. Após resfriamento, filtrou-se a solução. Ao filtrado juntou-se 10 mL de ácido clorídrico e 3mL de água oxigenada 30%. Após resfriamento, filtrou-se a solução. Extraiu-se por duas vezes com 5mL de éter etílico. Juntaram-se as fases etéreas e agitou-se com 3 mL de amônia diluída. A camada aquosa deverá tornar-se rósea em caso positivo.

4.6.5 Testes de identificação de alcaloides

Foram utilizadas 5g da droga vegetal pulverizada, sendo homogeneizada e

alcalinizada com carbonato de cálcio a 10%. Adicionou-se 25mL de clorofórmio e, depois de homogeneizado, filtrou-se a mistura para um funil de separação através de papel de filtro previamente embebido em clorofórmio, agitando o filtrado com 7mL de ácido clorídrico 2%. Essa solução aquosa foi utilizada nas reações com reagentes de Dragendorff, Mayer, Bertrand e Bouchardat, nas quais a precipitação ou turvação da solução indicam resultado positivo.

4.6.6 Testes de identificação de cumarinas

Uma pequena quantidade de droga vegetal foi colocada em um béquer e coberta com uma lâmina de vidro. Aqueceu-se o béquer por 10 minutos e o sublimado formado na lâmina foi recolhido com 0,5mL de metanol. Três gotas foram colocadas em papel de filtro, adicionando-se em seguida uma gota de solução etanólica de hidróxido de potássio (KOH). Expôs-se à luz ultravioleta e observou-se se ocorria formação de fluorescência verde.

4.6.7 Testes de identificação de metilxantinas

Em 5,0mL de ácido sulfúrico e 5,0mL de água destilada, 1g da droga vegetal foi aquecida até fervura. Após filtração, neutralizou-se o ácido com amônia diluída e extraiu-se com 5,0mL de clorofórmio em funil de decantação. Evaporou-se a fase orgânica e ao resíduo foram adicionados 3 gotas de ácido clorídrico 6N e 2 gotas de peróxido de hidrogênio, devendo aparecer coloração vermelha após evaporação. Ao resíduo, adicionou-se amônia diluída, sendo que a coloração violeta indica resultado positivo.

4.7 Cromatografia em camada delgada

A separação preliminar das substâncias contidas nos extratos foi realizada utilizando-se cromatografia em camada delgada (CCD) segundo Wagner et al. (1996).

4.7.1 Obtenção do extrato bruto e frações

O extrato hidroalcoólico da droga vegetal (partes aéreas) foi obtido por maceração com etanol 70% (100g de droga vegetal para 900 mL de solvente), durante 7 dias, sendo que a solução extrativa foi seca em evaporador rotativo, seguido de secagem em estufa a 40°C.

O extrato bruto obtido foi solubilizado em água destilada na proporção de 10g do extrato bruto para 100mL de água destilada. Seguiu-se partição líquido-líquido com solventes de polaridade crescente (hexano, acetato de etila e n-butanol) em proporções iguais de solução aquosa e solvente orgânico, seguindo-se secagem em evaporador rotativo e posteriormente em estufa (40°C), obtendo-se assim as frações a serem testadas: hexânica, acetato de etila, n-butanólica e aquosa.

4.7.2 Técnicas cromatográficas

As técnicas de cromatografia em camada delgada (CCD) seguiu inicialmente as condições de Wagner et al. (1996) quanto às fases móveis e reveladores utilizados para análise dos metabólitos secundários. As técnicas foram realizadas no Laboratório de Farmacognosia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, sob supervisão do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos. Durante os testes as fases móveis foram otimizadas (Tabela 1) para se obter uma melhor resolução cromatográfica. A fase estacionária utilizada foi sílica gel comercial em placa de alumínio (60 F₂₅₄/Merck).

Tabela 1: Fases móveis e reveladores utilizados na identificação de metabólitos secundários utilizando a técnica de cromatografia em camada delgada.

Metabólito Secundário	Fase Móvel (v/v)	Revelador
Flavonoides	n-butanol/ácido acético/água (60:37:3)	NP-PEG
Alcaloides	Clorofórmio/acetato de etila (60:40)	Dragendorff
Terpenos	hexano/acetato de etila/isopropanol (70:28:2)	Anisaldeído sulfúrico
Taninos	acetato de etila/ácido fórmico/água (80:10:10 e 90:5:5)	Solução etanólica de FeCl ₃ 1%

4.8 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

As técnica de cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE) foi realizada no Laboratório Multiusuário, UNESP, com a ajuda da Técnica Gabriela Merussi e sob supervisão do Prof. Dr. André Gonzaga dos Santos.

4.8.1 Preparo das amostras

Para análise por CLAE, 10,0mg de extrato bruto foram dissolvidos em 1,0mL de metanol: água (95:05, v/v), e submetido a pré-tratamento por extração em fase sólida numa pré-coluna SampliQ (C18 45 μ m; 500mg, 6mL) que foi ativada com metanol e condicionada com metanol: água (95:05, v/v). Após a aplicação da amostra, a coluna foi eluída com 4,0mL de metanol: água (95:05, v/v). O eluato foi seco num exsiccador com sílica gel, sob pressão reduzida, dissolvido em metanol (1,0mL), e filtrado através de membrana de PVDF (0,45 μ m) antes da análise por CLAE. O pré-tratamento foi repetido para as frações aquosa, hexano, acetato de etila e n-butanol.

Alíquota de 20 μ L foi injetado numa coluna Hypersil® Gold C18 (250mm x 4,6mm, 5 μ m), que foi eluída com uma mistura de metanol e água, inicialmente a 05:95 (v/v), mudando por gradiente linear a 30:70 ao longo de 40 min. A taxa de fluxo de fase móvel foi de 1,0mL min⁻¹. A detecção foi realizada em 250nm.

4.9 Teste de atividade anti-*Candida*

Os estudos da atividade anti-*Candida* foram realizados no Laboratório de Biotecnologia Farmacêutica da Faculdade de Ciências Farmacêuticas, UNESP, Campus de Araraquara, sob a supervisão da Profa. Dra. Rosemeire Cristina Linhari Rodrigues Pietro.

4.9.1 Seleção e cultivo das linhagens de leveduras

Para os testes foram utilizadas as cepas ATCC (American Type Culture Collection) de *Candida albicans* (90028), *C. krusei* (6258), *C. parapsilosis* (22012), *C. glabrata* (90030) e *C. tropicalis* (750). As cepas foram cultivadas em ágar Sabouraud e incubadas a 35°C durante 24 - 48 horas.

4.9.2 Preparo das amostras vegetais

Foram realizados cálculos para se obter uma concentração inicial no primeiro poço da microplaca de 2500 μ g mL⁻¹. Assim, foi feita uma solução mãe de 10mg/mL para o extrato e suas frações. Para o preparo da solução mãe foi utilizada água destilada para diluir o extrato bruto, fração aquosa, hexânica e n-butanólica, enquanto para fração acetato de etila foi realizada uma diluição inicial em dimetilsulfóxido (DMSO) e posteriormente uma nova diluição em água para se obter a solução mãe de 10mg mL⁻¹.

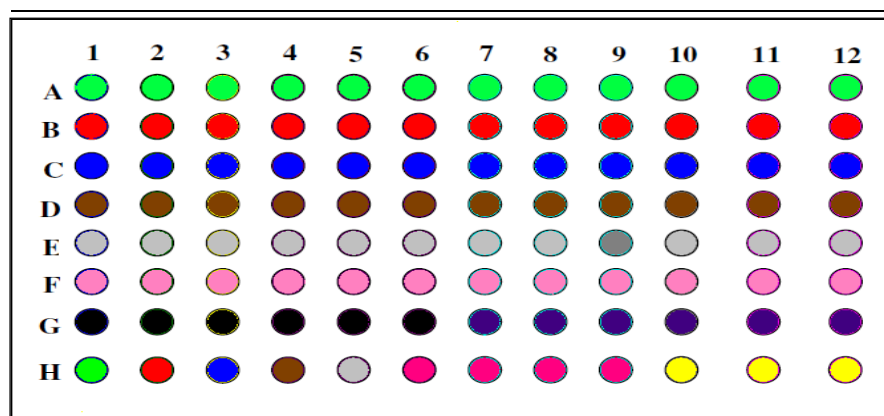
4.9.3 Determinação da concentração inibitória mínima (CIM) e da concentração fungicida mínima (CFM)

O ensaio de determinação da Concentração Inibitória Mínima (CIM) frente a leveduras do gênero *Candida* foi realizado utilizando a metodologia de diluição em microplaca, segundo a Norma M27-A3 de 2008 da Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), com modificações (CLSI, 2008).

O meio de cultura em caldo preconizado para ser utilizado para cultivo de *Candida* sp. é o RPMI-1640 contendo glutamina e vermelho de fenol, mas sem bicarbonato, suplementado de ácido 3-[N-morfino] propanosulfônico (MOPS) na concentração de $0,165 \text{ mol L}^{-1}$, com pH 7,0 e esterilizado por filtração, enquanto que o meio sólido apropriado é o ágar-Sabouraud.

Após a adição de 100 μL de RPMI 1640 a todos os poços, foram transferidos 100 μL das soluções diluídas do extrato, das frações para o primeiro poço de cada linha de microplacas. Também foram transferidos 100 μL da solução de controle positivo de anfotericina B e das soluções diluídas de controle negativo de DMSO conforme esquematizado na Figura 2.

Diluições seriadas de 100 μL foram realizadas e em seguida foram adicionados 100 μL da suspensão de levedura previamente preparada a todos os poços da microplaca (exceto naqueles destinados ao controle de esterilidade do meio) de forma que a concentração de células será de $2,5 \cdot 10^3$ leveduras mL^{-1} . As concentrações das amostras variaram de 1:1 a partir da maior até a menor concentração. As microplacas foram incubadas por 48h a 35°C sob agitação constante a 150 rpm. A inibição do crescimento fúngico foi evidenciada pela adição de 20 μL de resazurina (0,1%) após incubação a 35°C por cerca de 3 horas. O mecanismo baseia-se na redução da resazurina (cor púrpura) em resarufina (cor rósea), estando relacionado com a oxidação/redução do meio de cultura utilizado. A resazurina tem uma correlação direta com a quantidade/proliferação de organismos vivos, que incluem células fungicas (O'BRIEN et al., 2000).



● **Linha A:** Testes: meio de cultura + Amostra vegetal (extrato bruto) + *Candida* sp.

● **Linha B:** Testes: meio de cultura + Amostra vegetal (fração aquosa) + *Candida* sp.

● **Linha C:** Testes: meio de cultura + Amostra vegetal (fração hexânica) + *Candida* sp.

● **Linha D:** Testes: meio de cultura + Amostra vegetal (fração n-butanólica) + *Candida* sp.

● **Linha E:** Testes: meio de cultura + Amostra vegetal (fração acetato de etila) + *Candida* sp..

● **Linha F:** Controle: meio de cultura + Afotericina B + *Candida* sp.

● **Linha G (1 a 6):** Controle positivo: meio de cultura + *Candida* sp.

● ● ● ● ● **Linha H (1-6):** Controle negativo: meio de cultura + Amostra vegetal

● **Linha G (7 a 12):** Controle negativo: Meio de cultura

● **Linha H (6 a 9):** Controle negativo: meio de cultura + DMSO.

● **Linha H (10 a 12):** Controle positivo: meio de cultura + DMSO + *Candida* sp.

Figura 4: Esquema da técnica de diluição em microplacas.

Antes da adição de resazurina, foi realizada uma sub-cultura de cada microplaca utilizando meio ágar Sabouraud em placa de Petri de 12cm diâmetro para determinação da concentração fungicida mínima, que consistiu na passagem de amostras de cada poço da microplaca, utilizando palitos esterilizados, para placa de Petri marcada devidamente com localidade de cada poço, . As placas foram incubadas por 24h a 35°C. A concentração fungicida mínima foi então observada pela ausência ou presença de crescimento da levedura (HAWSER & ISLAM, 1999). Os testes foram realizados em triplicata.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1 Estudo anatômico

O estudo anatômico é de fundamental importância para a correta identificação de espécies vegetais, onde diversos marcadores anatômicos podem ser utilizados para diferenciação de matérias-primas vegetais submetidas ao controle de qualidade. Por ser uma técnica rápida e de baixo custo, pode ser utilizada tanto em indústrias como em farmácias.

Como vistos na Figura 3 cortes transversais na região da nervura central e no bordo das folhas de *Cordia verbenacea* apresentam as seguintes estruturas:

A epiderme adaxial apresenta células maiores que a epiderme abaxial, porém com tamanhos e formas diferenciadas, quase sempre alongadas (Figura 3G, H e I). Tanto na face adaxial quanto na abaxial nota-se na epiderme a presença de tricomas tectores unicelular com base plurecelular (Figura 3D) e tricomas glandulares de cabeça unicelular (Figura 3E), observa-se que as bases dos tricomas abaula ligeiramente as células epidérmicas, já na face abaxial verifica-se estômatos do tipo anomocítico (Figura 3F). Akisue et al. (1983) descreveu ainda na epiderme adaxial a presença de cristólitos, porém a metodologia utilizada por ele não apresentou estudos com luz polarizada, na qual o cristal presente no cristólito apresentaria luminescência, assim após uma varredura com luz polarizada pode-se constatar que a estrutura era na verdade a região de base de tricoma tector, o qual foi seccionado durante o procedimento de cortes anatômicos para preparação das lâminas (Figura 3I e J).

No mesofilo, que é do tipo dorsiventral, pode-se observar parênquima paliçádico (Figura 3G e H) constituído de uma única camada de células ocupando praticamente metade do mesofilo e parênquima lacunoso (Figura 3G e H) com células de contorno arredondado, o qual em seu meio ocorre frequentemente a presença de idioblastos contendo areia cristalina (Figura 3I e J), verifica-se também regiões vascularizadas com feixes vasculares secundários.

Na região da nervura central, pode-se observar, 3 a 4 camadas de colênquima do tipo angular (Figura 3C), os feixes vasculares são colaterais e em meio ao parênquima fundamental, o qual é bem desenvolvido, observa-se diversos idioblastos contendo areia cristalina (Figura 3K e L).

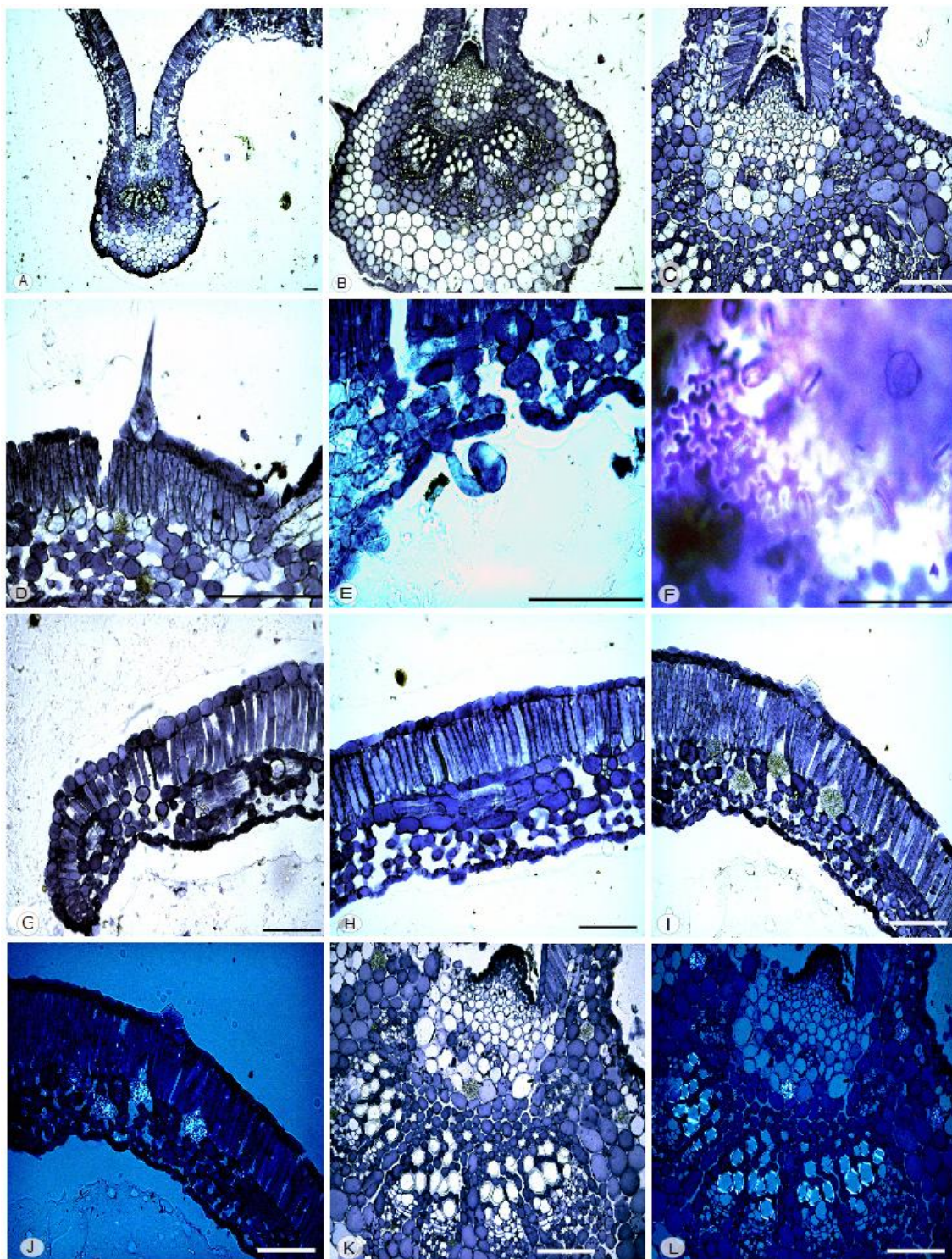


Figura 5: Fotomicrografias do aspecto anatômicos de Folhas de *Cordia verbenacea*. A: Região da nervura central; B: nervura central com destaque para distribuição do xilema e floema; C: nervura central, com detalhe do colênquima; D: tricoma tector; E: tricoma glandular; F: estômatos anomocíticos; G: Região do mesofilo; H: região do mesofilo com destaque para os feixes vasculares secundários; I, J, K e L: Idioblastos contendo areia cristalina presentes no mesofilo e no parênquima fundamental. Escala: 100μm

5.2 Estudo histoquímico

A análise histoquímica (Tabela 2) de *Cordia verbenacea* evidenciou a presença dos seguintes grupos de metabólitos (Figura 4): lipídios totais, óleos essenciais, esteroides, terpenoides com grupo carbonila, compostos fenólicos, flavonoides e pectinas.

Tabela 2: Perfil histoquímico de folhas da espécie *Cordia verbenacea*.

Reagente	Metabólitos	<i>Cordia verbenacea</i>
Sudam III	Lipídios totais	+
Sulfato azul do Nilo	Lipídios ácidos e neutros	-
Reagente de NADI	Óleos essenciais	+
Tricloreto de antimônio	Esteroides	+
Ácido sulfúrico+glicerina	Lactonas sesquiterpênicas	-
2,4-dinitrofenilhidrazina	Terpenoides com grupo carbonila	+
Cloreto férrico	Compostos fenólicos	+
Ácido Clorídrico	Flavonoides	+
Vanilina clorídrica	Taninos	-
Dicromato de Potássio	Compostos fenólicos	+
Dragendorff	Alcaloides	-
Lugol	Amido	-
Vermelho de rutênio	Pectina	+
Azul brilhante de Comassie	Proteínas totais	-

Alguns resultados negativos como o caso do teste para taninos podem estar relacionados à época de coleta da espécie, pois, podem ocorrer variações de sazonalidade. Sendo assim outros estudos devem ser efetuados para uma confirmação mais precisa da ocorrência dessas classes de metabólitos secundários.

Entre os resultados positivos, a literatura já evidenciava para *Cordia verbenacea* a presença de flavonoides (MATIAS et al., 2010), óleos essenciais (JORGE et al., 1998) e terpenos (DE CARVALHO et al., 2004).

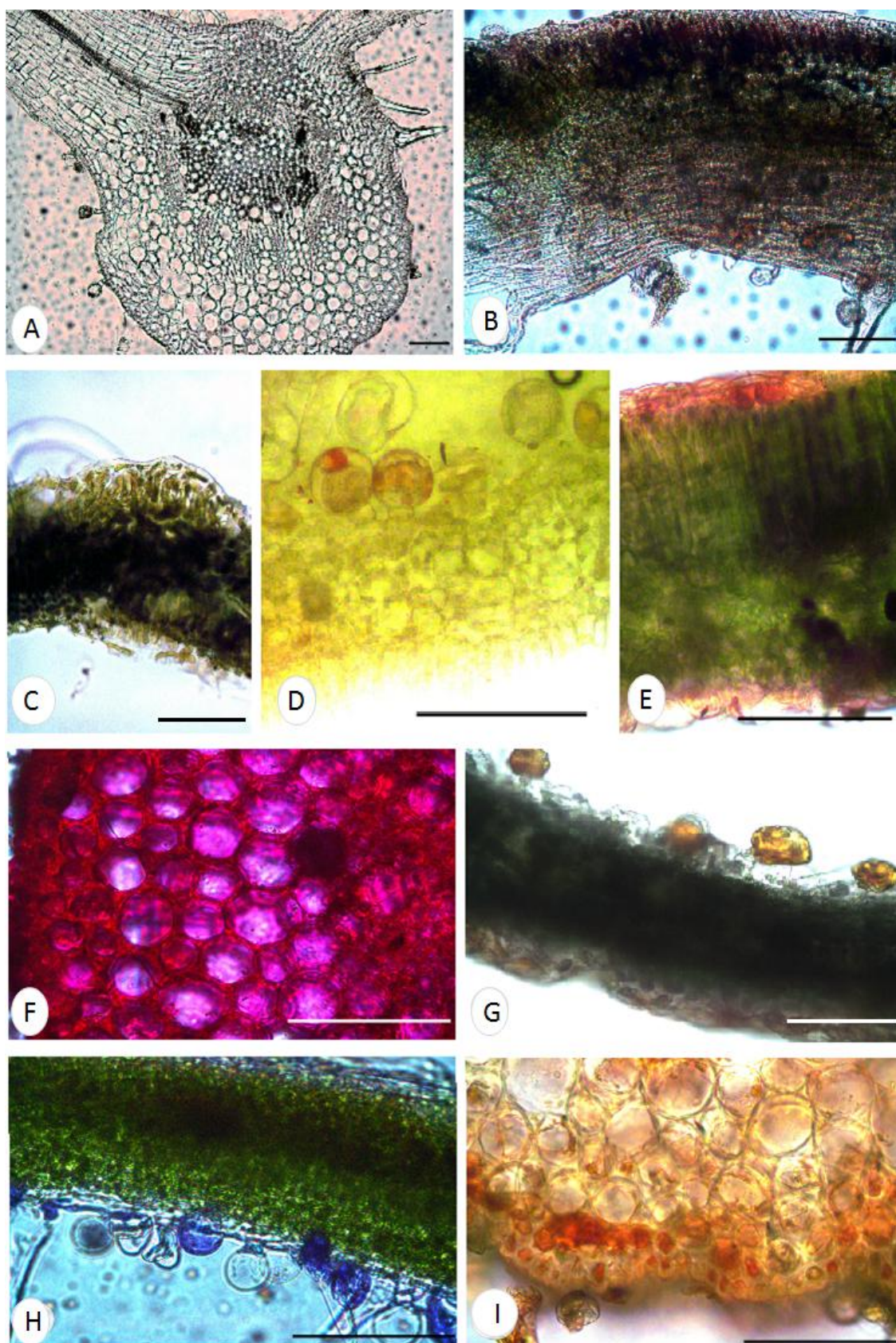


Figura 6: Fotomicrografia apresentando os resultados positivos dos testes histoquímicos realizados em folhas de *Cordia verbenacea*. A: controle, B e E: compostos fenólicos, C: flavonoides, D: lipídios totais, F: pectinas, G: esteroides e H: óleo essencial e I: terpenoides com grupo carbonila. Escala: 100µm.

5.3 Determinação das características físico-químicas da droga vegetal

De modo geral, para se observar os resultados das análises de caracterização físico-química desenvolvidas, seguem os valores determinados para cada parâmetro (Tabela 3), referente à droga vegetal (partes aéreas) utilizada no estudo, os quais serão abordados com maiores detalhes na sequência do texto.

Tabela 3: Parâmetros físico-químicos de qualidade da droga vegetal obtida a partir das partes aéreas de *Cordia verbenacea*.

Determinações físico-químicas	Resultados
Perda por secagem do vegetal fresco (%)	77,65 ±0,98
Granulometria	pó moderadamente grosso
Tamanho médio de partícula (mm)	0,4293 ±0,008
Densidade relativa (g mL ⁻¹)	0,374 ±0,0021
pH	7,01 ±0,011
Perda por dessecação (%)	8,40 ±0,21
Cinzas totais (%)	17,40 ±0,46
Cinzas insolúveis em ácido (%)	1,02 ±0,06
Teor de extrativos (%)	31,48 ±0,49

Partes aéreas de *Cordia verbenacea* foram mantidas em estufa de circulação de ar à temperatura de 40° C, até estabilização da massa (72 horas). A determinação da perda por secagem a 40° C é importante para idealizar o tempo necessário de exposição da planta ao processo de secagem para que ocorra a estabilização da massa do material vegetal, fato importante, devido a presença de água no material vegetal fresco, o que pode propiciar, com o tempo e exposição, a proliferação de micro-organismos e continuidade de atividades enzimáticas, prevenindo dessa forma a degradação de compostos de interesse. É um parâmetro de qualidade e validação do processo de secagem para se obter uma padronização do tempo necessário para se obter massa constante. O valor do resultado para perda por secagem do vegetal fresco obtido foi de 77,65% em relação a sua massa total, constando a perda de água e também de materiais voláteis.

Posteriormente foi realizado o teste para a determinação do teor de umidade, pela perda por dessecação do material analisado, com resultado de 8,4%, mostrando que o processo foi eficiente para manter a umidade <14% (FARMACOPEIA BRASILEIRA, 1988), Valores de umidade acima do limite especificado podem favorecer o crescimento de micro-organismos e a degradação química ou enzimática da droga vegetal.

A avaliação granulométrica do material vegetal pulverizado é um parâmetro imprescindível a ser estabelecido. Ao determinar a granulometria do pó resultante da droga vegetal, pode-se estimar a eficiência do processo de moagem utilizado, correlacionando-o ao grau de divisão da droga vegetal obtido e, deduz-se que o maior grau de pulverização da droga vegetal representa uma influência direta sobre a eficiência no processo extrativo e mistura (SIMÕES et al., 2010). Por isso, é de suma importância a determinação do tamanho das partículas da droga vegetal, a qual se está manipulando, visto que o seu tamanho é relevante para as análises propostas neste trabalho. A análise estatística dos resultados obtidos para a determinação da granulometria e tamanho médio de partícula, foi realizada em intervalos de tamanhos diferentes de tamises e, representados na forma de histograma (Figura 5), gerado a partir de dados da faixa granulométrica, o qual permitiu que o percentual de partículas apresentadas num dado diâmetro equivalente fosse determinado.

Verifica-se que a maior parte de suas partículas apresentam-se entre as faixas granulométricas de 180 a 850 μm , como apresentado na Figura 5, caracterizando-se como pó moderadamente grosso, segundo a classificação da Farmacopeia Brasileira (2010) e, o valor do tamanho médio das partículas do pó apresentado (Tabela 3) foi de 0,4293 mm, segundo os valores representativos da análise granulométrica e, sendo determinado pelo cálculo descrito segundo Ansel e colaboradores (2000). Dessa forma, o tamanho das partículas da droga pulverizada representa diretamente uma influência sobre a eficiência no processo extrativo, pois para aqueles que envolvem filtração, um pó muito fino pode favorecer o entupimento do filtro e, tecidos mais rígidos podem dificultar a penetração do solvente, sendo que para esses, suas partículas devem ser menores (HUBINGER, et al. 2009).

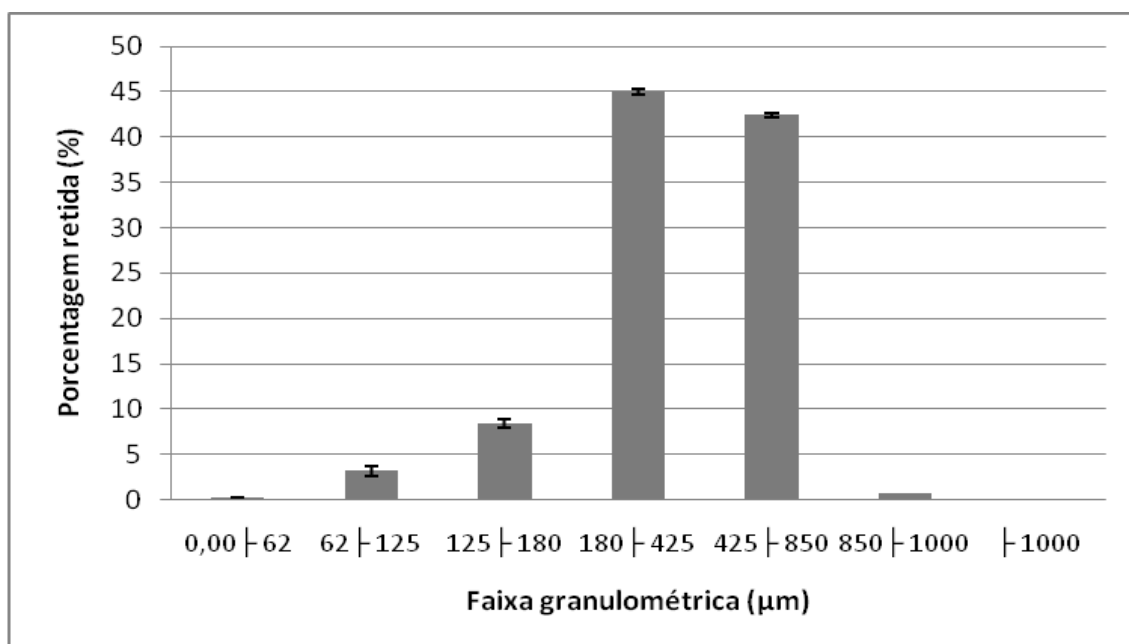


Figura 7: Distribuição do tamanho das partículas da droga vegetal obtida das partes aéreas de *Cordia verbenacea*.

A densidade da droga vegetal é um parâmetro que pode ser analisado e, de acordo com sua avaliação, teve como resultado um valor de densidade aparente de $0,374 \text{ g mL}^{-1}$.

A determinação potenciométrica do pH foi obtida, pela leitura em peagômetro, indicando como resultado o valor de 7,01 unidades de pH. Para uma melhor reprodutibilidade da análise, o valor do pH da água deionizada também foi verificado, devido ao fato desta ser utilizada no procedimento para a obtenção da solução extrativa e seu valor foi de 6,66 unidades de pH. O que sugere a presença de substâncias básicas na droga vegetal estudada.

Quanto à determinação do teor de cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido, para as partes aéreas de *Cordia verbenacea*, os teores obtidos foram de 17,40% e de 1,02%, respectivamente. Por se tratar de uma droga vegetal, o objetivo desta análise é a verificação de impurezas inorgânicas de natureza fisiológica e não-fisiológica, essas impurezas podem ser de materiais estranhos como partículas do solo depositadas sobre as superfícies da planta ou minerais acumulados pela planta para seu desenvolvimento.

O rendimento observado na análise do teor de extrativos foi de 31,48%. Porém, é importante levar em consideração a substância que se deseja extrair. Como para flavonoides foi demonstrado que a mistura etanol:água é eficiente para a extração desses compostos com polaridade alta (HUBINGER et al., 2009).

5.4 Análise fitoquímica preliminar e cromatografia em camada delgada (CCD)

As plantas medicinais apresentam metabólitos secundários diferentes em sua composição química, isso à leva poder ter alguns tipos de marcadores químicos, facilitando sua diferenciação e sua área de atuação farmacológica. Assim, de acordo com a literatura, a espécie *Cordia verbenacea* tem como metabólito secundário os flavonoides, principalmente a artemetina (MATIAS et al., 2010).

A cromatografia em camada delgada, que é um método físico-químico de separação e está fundamentada na migração diferencial dos componentes de uma mistura, que ocorre devido a diferentes interações, entre duas fases imiscíveis, a fase móvel e a fase estacionária, assim com uma grande variedade de combinações entre fases móveis e estacionárias a torna uma técnica extremamente versátil e de grande aplicação (DEGANI et al. 1998). Assim a Cromatografia em camada delgada e triagem fitoquímica preliminar (Tabelas 3 e 4), ajudaram a determinar a presença dos metabólitos secundários presentes na droga vegetal (originada de partes aéreas) estudada.

Tabela 4: Resultados referentes à triagem fitoquímica preliminar da droga vegetal pulverizada das partes aéreas de *Cordia verbenacea*.

Metabólitos secundários	Método de reação	Resultados
Saponinas	Índice de espuma	+
Taninos	Gelatina	+
	Cloreto férrico	+
	Shinoda	-
Flavonoides	Taubock	+
	Pew	-
	Cloreto férrico	+
	Cloreto de alumínio	+
Antraquinonas	Livres	-
	Combinadas	-
Alcaloides	Dragendorff	+
	Mayer	-
	Bertrand	-
	Bourchardat	+
Cumarinas	Detecção por UV	-
Metilxantinas	Reação com amônia	-

A análise fitoquímica preliminar (Tabela 4), realizada com partes aéreas de *Cordia verbenacea*, constatou a presença de saponinas, taninos, flavonoides e alcaloides. Porém o resultado positivo para alcaloides na triagem fitoquímica é discutível, pois diante das reações utilizadas para sua determinação apenas as reações de Dragendorff e Bourchard apresentaram resultados positivos e ainda assim, apresentaram-se com uma pequena turvação, o que pode levar a falsos positivos, desta forma ao compara-lo com o resultado negativo para alcaloides em CCD (Figura 6 A) e nos testes histoquímicos (Item 5.2), pode-se constatar que os resultados da triagem apresentaram apenas traços de alcaloides. Um outro aspecto que ajuda a explicar os traços de alcaloides na triagem fitoquímica é que em algumas outras espécies da família das Boraginaceas como *Cordia sellowiana* Cham. e *Cordia myxa* L. (Boraginaceae Jussieu), apresentam alcaloides como um dos seus principais metabólitos (BARROSO & OLIVEIRA, 2009), dessa forma por serem da mesma família, apresentam indícios de marcadores químicos similares, porém não necessariamente em quantidade significativa.

Ainda a análise em cromatografia em camada delgada (CCD), confirmou a presença de flavonoides no extrato bruto e em todas as frações, com manchas intensas na fração n-butanol, cuja presença já era constatada por Matias et al., (2010) que afirma que um dos ativos terapêuticos da espécie em estudo são os flavonoides, confirmando assim o resultado positivo nos testes histoquímicos (Item 5.2) e na triagem fitoquímica preliminar. No entanto, o teste de Shinoda (flavonas, flavonóis e flavononas) apresentou resultado negativo para a amostra estudada, entrando em desacordo com a literatura que afirma a presença de flavonas no caso a artemetina para a espécie em questão, porém este resultado pode estar relacionado a um efeito de sazonalidade, pois não se sabe em que época do ano pesquisadores coletaram a espécie para realizarem seus estudos.

Foi evidenciado a presença de terpenos no extrato bruto e nas frações hexano e acetato de etila (Figura 6C), já evidenciados no óleo essencial de *C. verbenacea* por De Carvalho et al.(2004) nas formas de monoterpenos e sesquiterpenos, que entre seus constituintes pode-se citar o α -pineno, aloaromadendreno, trans-cariofileno, α -humuleno e o-gurjuneno, confirmando também a presença já evidenciada no teste histoquímico. Taninos no extrato bruto e frações aquosa, n-butanol e acetato de etila (Figura 7 A e B). Para os taninos foram utilizadas duas fases móveis para se observar manchas mais e menos polares que eram muito arrastados ou ficavam retidas na origem,

essa análise serviu para evidenciar a presença de taninos, o qual, foi evidenciado na triagem fitoquímica preliminar, porém não foi evidenciado no teste histoquímico.

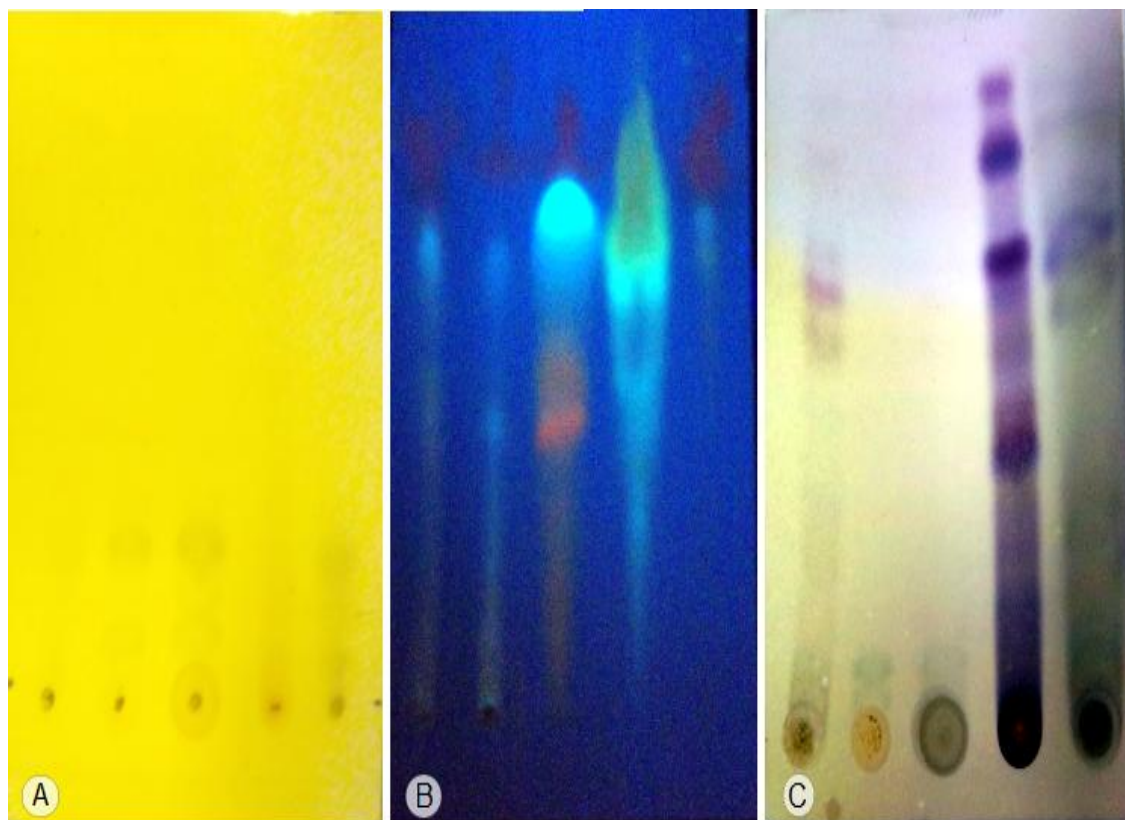


Figura 8: Determinação da presença e ausência de metabólitos secundários em *Cordia verbenacea* por cromatografia em camada delgada. Distribuição na placa: extrato bruto/fração aquosa/n-butanol/hexano/acetato de etila. A: Ausência de Alcaloides, revelador Dragendorff e fase móvel Cloroformio/acetato de etila (60:40); B: Presença de flavonoides no extrato bruto e em todas as frações, revelador NP-PEG e fase móvel n-butanol/ácido acético/água (60:37:3); C: Presença de terpenos no extrato bruto e nas frações hexano e acetato de etila, revelador anisaldeído sulfúrico e fase móvel Hexano/acetato de etila/isopropanol (70:28:2).

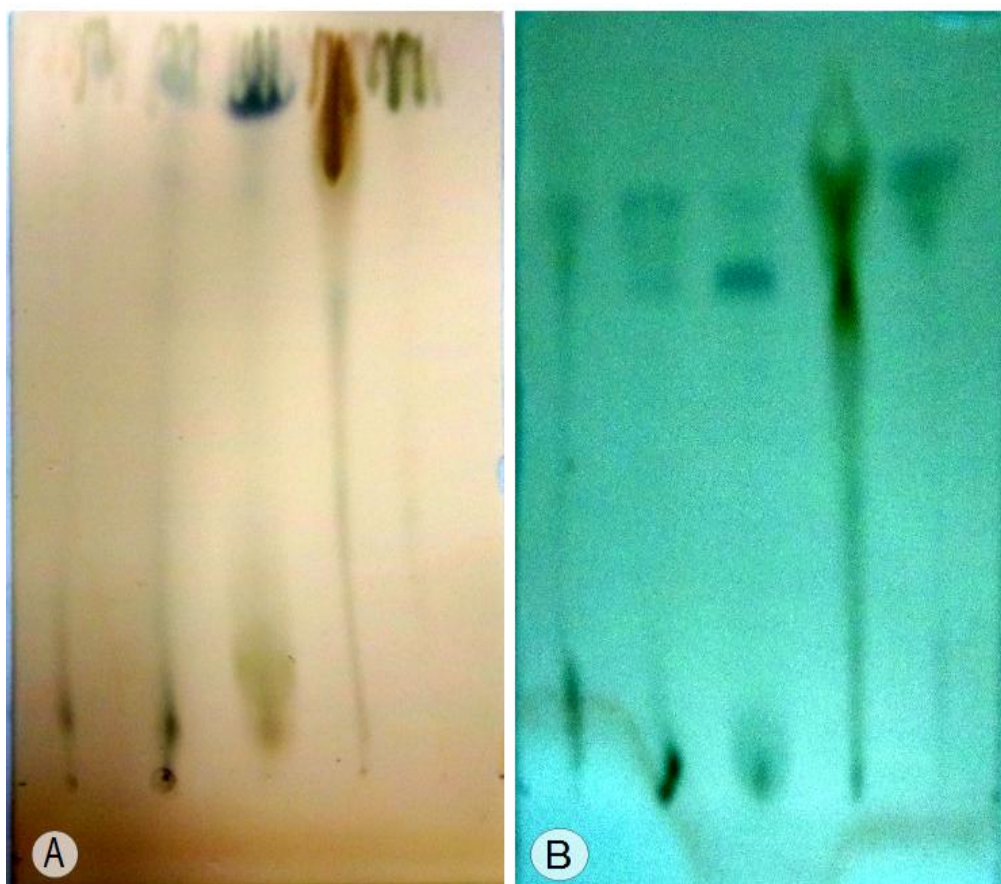


Figura 9: Determinação da presença de metabólitos secundários em *Cordia verbenacea* por cromatografia em camada delgada. Distribuição na placa: extrato bruto/fração aquosa/n-butanol/hexano/acetato de etila. A: Presença de taninos no extrato bruto e frações aquosa, n-butanol, revelador solução etanólica de FeCl_3 1% e fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/água (80:10:10); B: Presença de taninos no extrato bruto e frações aquosa, n-butanol e acetato de etila, revelador solução etanólica de FeCl_3 1% e fase móvel acetato de etila/ácido fórmico/água (90:5:5).

5.5 Cromatografia líquida de alta eficiência – CLAE

Nenhum registro das técnicas cromatográficas contemporâneas será completo se não incluir a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE). É um tipo de cromatografia líquida empregando pequenas colunas, recheadas de materiais especialmente preparados e uma fase móvel que é eluída sob altas pressões. Tem a capacidade de realizar separações e análises quantitativas de uma grande quantidade de compostos presentes em vários tipos de amostras, em uma rápida escala de tempo, com alta resolução, eficiência e sensibilidade.

A análise dos perfis cromatográficos das frações (Figura 8 e Figura 8a) demonstra a eficiência do procedimento de fracionamento do extrato bruto de *Cordia*

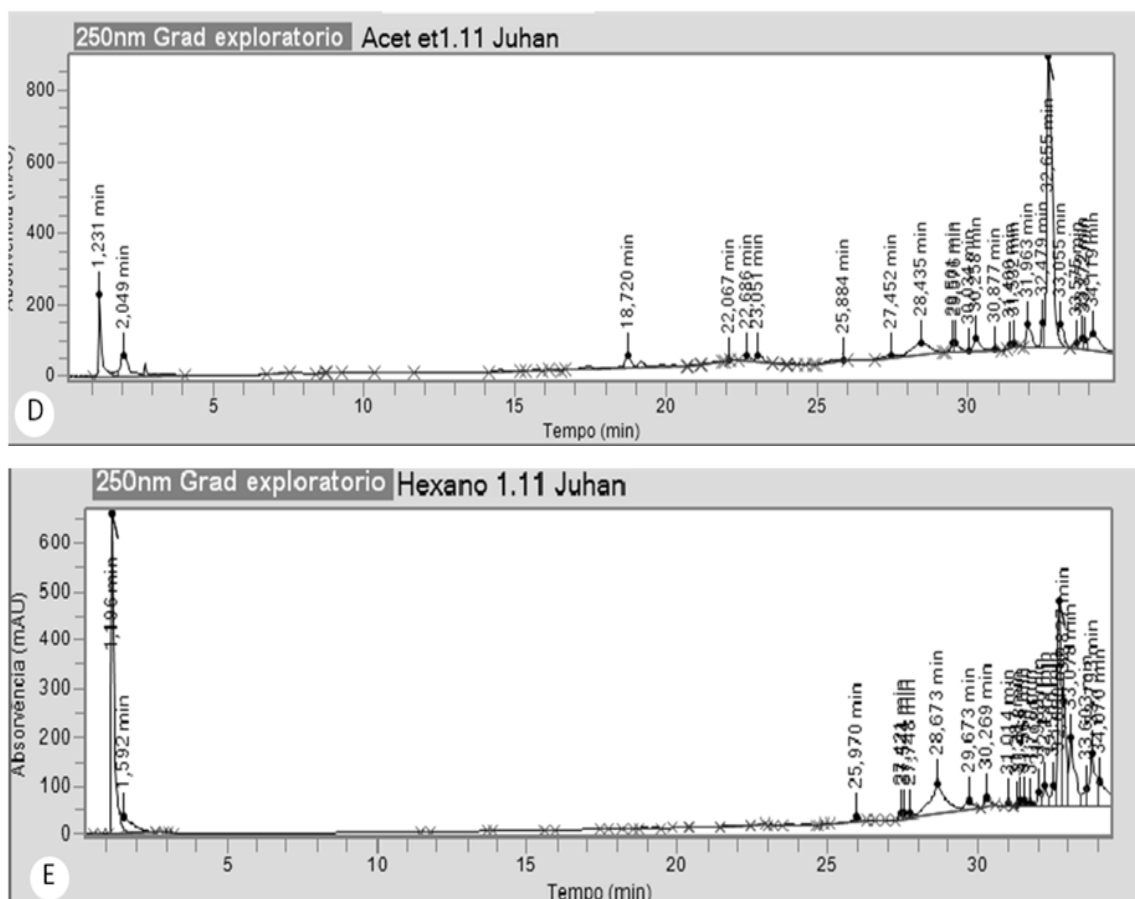


Figura 10a: Cromatogramas do extrato bruto de *Cordia verbenacea* e suas frações utilizando CLAE. D: Fração Acetato de etila; E: Fração hexano.

5.6 Determinação da atividade anti-*Candida*

Não existe consenso sobre o nível de inibição aceitável nos produtos naturais quando comparados com antifúngicos padrões, pois provavelmente a ocorrência de um sinergismo entre vários componentes presentes nos extrato é o causador da atividade (GUEDES et al. 2009), podendo ser relacionados a outros fatores, como por exemplo, fatores ambientais como: sazonalidade, ritmo circadiano, locais de cultivo, entre outros, pois tais fatores podem influenciar na produção dos metabólitos ativos das plantas.

Aligianis et al. (2001) propôs uma classificação para materiais vegetais baseando-se nos resultados de CIM, considerando como forte inibição a CIM até 500µg mL⁻¹; inibição moderada a CIM entre 600 e 1500µg mL⁻¹e como fraca inibição a CIM acima de 1600µg mL⁻¹. Enquanto outros autores como Mbaveng et al. 2012 e Rios & Recio, 2005 citam que uma concentração inibitória muito interessante é de 100µg mL⁻¹ de extrato bruto porém, Mbaveng et al. (2012) ainda considera uma atividade

moderada os valores de MIC que variam entre 100-625 $\mu\text{g mL}^{-1}$.

Assim, conforme os resultados obtidos e descritos na Tabela 5, o extrato bruto de *Cordia verbenacea*, teve uma fraca atividade contra cepas de *C. albicans*, uma moderada atividade contra *C. parapsilosis*, e uma forte atividade contra *C. tropicalis*, *C. krusei* e *C. glabrata*, porém apresentou atividade fungicida apenas contra as cepas *C. tropicalis* e *C. krusei*.

As frações aquosa e n-butanol, não apresentaram nenhuma atividade até a concentração de 2500 $\mu\text{g mL}^{-1}$ contra *C. albicans*, contra *C. parapsilosis* a fração n-butanol obteve uma moderada atividade, enquanto que a fração aquosa obteve uma fraca atividade, ambas as frações tiveram moderada atividade contra *C. tropicalis* e forte atividade contra *C. krusei* e *C. glabrata*. Enquanto as frações hexano e acetato de etila, pode-se verificar uma moderada atividade contra cepas de *C. albicans*, *C. parapsilosis* e *C. tropicalis* e uma forte atividade contra *C. glabrata* e *C. krusei*.

Todas as frações e o extrato bruto tiveram seus melhores resultados contra cepas de *C. glabrata* e igualmente entre todos apenas foi inibido o crescimento desta cepa, sem conseguir matá-la, ou seja, as frações juntamente com o extrato bruto são fungistáticas, como verificado no CFM da *C. glabrata*.

Tabela 5: Concentração inibitória mínima (CIM) e concentração fungicida mínima (CFM) ($\mu\text{g mL}^{-1}$) do extrato bruto de *Cordia verbenacea* e suas frações.

	<i>C. albicans</i>		<i>C. parapsilosis</i>		<i>C. glabrata</i>		<i>C. tropicalis</i>		<i>C. krusei</i>	
	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM	CIM	CFM
Ext. bruto	2500	>2500	625	>2500	9,77	>2500	312,5	312,5	312,5	2500
F. aquoso	>2500	>2500	2500	>2500	9,77	>2500	625	>2500	312,5	625
F. hexano	1250	>2500	1250	1250	39,06	>2500	625	625	312,5	625
F. n-butanol	>2500	>2500	1250	>2500	19,53	>2500	625	625	312,5	>2500
F. acetato	1250	>2500	1250	1250	19,53	>2500	625	1250	625	2500
Anfotericina B	0,25	0,25	0,50	0,50	0,50	0,50	0,50	2,00	0,50	0,50

Desta forma, dentre todos os resultado um dos fatos que mais se chama a atenção é a forte ação fungistática obtida contra *C. glabrata* onde o CIM varia de 9,77 a 39,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$, porém não se obteve nenhuma atividade fungicida quando determinado o CFM. Desta forma, essa variância pode estar relacionada à presença de taninos, no

extrato bruto e em quase todas as frações como verificado na análise em cromatografia em camada delgada (Figura 7), pois os taninos apresentam atividade fungistática (PASSOS et al., 2002) além das outras classes de metabólitos secundários que foram determinados pela CCD, triagem fitoquímica e testes histoquímicos, que já demonstraram atividade antimicrobiana, como flavonoides e terpenos (ARIF et al., 2009; COWAN, 1999), assim, as cepas de *C. glabrata* se demonstraram mais sensíveis para atividade fungistática do que em relação as demais cepas. Este dado é de muita utilidade devido a *C. glabrata* ser uma das espécies não-*albicans* que mais atinge a população em geral, além ser resistente aos azólicos e outros antifúngicos, como no caso do fluconazol (AGHA et al., 2011).

Em comparação com estudos de atividade antifúngica do óleo essencial de *Cordia verbenacea*, estes resultados apresentaram um desempenho muito superior relacionados às cepas de *C. parapsilosis*, *C. glabrata*, *C. tropicalis* e *C. krusei*. Assim, comparando os resultados deste estudo com os resultados dos estudos realizados por Rodrigues et al. (2011), o qual, fez teste de atividade antimicrobiana utilizando o óleo essencial de *Cordia verbenacea* obtendo valores de CIM $512\mu\text{g mL}^{-1}$ para *C. albicans* e *C. krusei*, os resultados apresentados na tabela acima mostram valores muito mais eficazes no caso de *C. krusei*, além de apresentarem atividade contra outras espécies de *Candida*. Vale ressaltar que as cepas utilizadas para ambos os estudos são diferentes (isolados), podendo haver discrepâncias nas comparações dos resultados.

Pode-se também chamar a atenção para as cepas de *C. tropicalis*, a qual se obteve os melhores valores de CFM relacionados ao extrato bruto e as frações n-butanol, hexano e acetato de etila, frações estas que contém substâncias menos polares como citado na parte do perfil cromatográfico por CLAE (Item 5.5).

Desta forma, uma possível ampliação de estudos com *Cordia verbenacea* não apenas focados no óleo essencial, mas também na produção de extratos, seria uma importantes estratégias na busca por novas substâncias ativas, com atividade antifúngica.

6. CONCLUSÃO

Consideraram-se úteis para o controle físico-químico da droga vegetal, os valores de perda por dessecação, cinzas totais e cinzas insolúveis em ácido. O local de coleta dos ramos se deu em área de cultivo de excelência, ressaltando assim que os valores encontrados servem como parâmetros para futuras análises.

Há metabólitos secundários que servem como marcadores químicos para se verificar a autenticidade da droga vegetal e também como motivo para futuros estudos fitoquímicos, como no caso dos flavonoides, taninos e terpenos que foram evidenciados nos testes histoquímicos, triagem fitoquímica preliminar e na cromatografia em camada delgada.

O estudo anatômico demonstrou a ocorrência de tricomas e idioblastos cristalíferos com areia cristalina nas regiões do mesofilo e nervura central, podendo assim servir como diferenciadores anatômicos.

A atividade anti-*Candida* demonstrou ação promissora para o extrato bruto e suas frações, retratando uma parte da atividade biológica dos metabolitos extraídos, principalmente contra as cepas não-*albicans*, sendo elas, *C. parapsilosis*, *C. glabrata* (a qual se obteve os melhores resultados para CIM, variando de 9,77 a 39,06 $\mu\text{g mL}^{-1}$), *C. tropicalis* e *C. krusei*.

Verificou-se, então uma possível ampliação de estudos com *Cordia verbenacea* não apenas focados no óleo essencial, mas também na produção de extratos, uma das importantes estratégias na busca por novas substâncias ativas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGHA, M.A.; AGHA, S.A.; SHARAFAT, S.; ZAFAR, M.N.; KHANANI, M.R.; MIRZA, M.A. *Candida glabrata*: an emerging threat for the immunocompromised. **Gomal Journal of Medical Sciences**, v. 9, n. 1, p. 115-119, 2011.

AKERELE, O. Summary of who guidelines for the assessment of herbal medicines. **Herbal Gram**, v. 28, p. 13-20, 1993

AKISUE, M.K.; OLIVEIRA, F.; MORAES, M.S.; AKISUE, G.; MANCINI, B. Caracterização farmacognóstica da droga e da tintura de *Cordia verbenacea* AL. DC. – Boraginaceae. **Revista de Ciências Farmacêuticas**, v. 5, p. 69-82, 1983.

ALIGIANNIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; MITAKU, S.; CJINOU, I.B. Composition and Antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**. v. 49, p. 4168-4170, 2001.

ALVES, I.A.; CAMARGO, F.P.; GOULART, L.S. Identificação por PCR e sensibilidade a antifúngicos de isolados clínicos vaginais de *Candida* sp. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 5, p. 575-579, 2010.

AMOSTRAGEM. **Métodos de farmacognosia**. In: FARMACOPEIA brasileira. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. 1, p. v.4.2.1.

ANSEL, H.C.; POPOVICH, N.G.; ALLEN JR, L.V. **Farmacotécnica**: formas farmacêuticas e sistemas de liberação de fármacos. São Paulo: Premier, 2000. 177p.

BRASIL. Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 10, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre a notificação de drogas vegetais junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária e dá outras providências. **Diário Oficial da União**, Brasília, DF, 10 mar. 2010.

ANVISA – Resolução da Diretoria Colegiada – RDC 14, de 9 de março de 2010. Dispõe sobre o registro de medicamentos fitoterápicos junto à Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) E DÁ OUTRAS PROVIDÊNCIAS. Brasília, 2010.

ANAISSE, E.; ANDERSON M. D. Opportunistic mycoses in the immunocompromised host: experience at a cancer center and review. **Clinical Infectious Diseases**, v.14, n.1, p.43-53, 1992.

ARIF, T.; BHOSALE, J.D.; KUMAR, N.; MANDAL, T.K.; BENDRE, R.S.; LAVEKAR, G.S.; DABUR, R. Natural products – Antifungal agents derived from plants. **Journal of Asian Natural Products Research**, v. 11, n. 7, p. 621-638, 2009.

ASCENSÃO, L. **Técnicas histoquímicas convencionais de microscopia de fluorescência aplicadas em espécies de Cerrado**. Botucatu: IB-UNESP, 2003. 20 p. (mimeogr.)

AULTON, M.E. **Delineamento de formas farmacêuticas**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2005. p.162-168, 177-184.

BALBINO, E. E.; DIAS, M. F. Farmacovigilância: um passo em direção ao uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 6, n. 20, p. 992-1000, Fev. 2010.

BARROSO, I.C.E.; OLIVEIRA, F.; BRANCO, L.H.Z.; KATO, E.T.M.; DIAS, T.G. O gênero *Cordia* L.: Botânica, química e farmacologia. **Revista Lecta**. v. 20, n. 1, p. 07-14, 2002.

BARROSO, I.C.E.; OLIVEIRA, F. Caracterização farmacognóstica dos Frutos de *Cordia sellowiana* Cham. e de *Cordia myxa* L. (Boraginaceae Jussieu). *Revista brasileira de farmacognosia*, v. 19, n. 2A, p.458-470, 2009.

BENDAZZOLI, W. S. Fitomedicamentos: perspectivas de resgate de uma terapia histórica. **Mundo Saúde**, v. 24, n. 2, p. 123-126, 2000.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Plantas de interesse do SUS**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/visualizar_texto.cfm?idtxt=30277. Acesso em: 19 mar 2013.

CAIN, A.J. The use of Nile Blue in the examination of lipids. **Q J Microsc Sci**, v.88, p.383-392, 1947.

CLSI. CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing os yeasts; approved standard, CLSI document M27-A3, Wayne, Pennsylvania: CLSI, 2008.

CORDEIRO, C.H.G.; SACRAMENTO, L.V.S. CORRÊA, M.A.; PIZZOLLITO, A.C.; BAUAB, T.M. Análise farmacognóstica e atividade antibacteriana de extratos vegetais empregados em formulações para a higiene bucal. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 42, n. 3, jul./set., 2006

COSTA, A.F. **Farmacognosia**: farmacognosia experimental. 3. ed. Lisboa: Calouste Gulbenkian, v. 3, p. 303, 308-309, 2001.

COUTINHO, M.A.S.; MUZITANO, M.F.; COSTA, S.S. Flavonoides: Potenciais agentes terapêuticos para o processo inflamatório. **Revista Virtual de Química**, v. 1, n. 3, p. 241-256, 20098.

COWAN, M.M. Plant products as antimicrobial agents. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 12, n.4, p. 564-582, 1999.

CROCCO, E.I.; MIMICA, L.M.J.; MURAMATU, L.H. GARCIA, C.; SOUZA, V.M.; RUIZ, L.R.B.; ZAITZ, C. Identificação de espécies de *Candida* e susceptibilidade antifúngica *in vitro*: estudo de 100 pacientes com candidíases superficiais. **An. Bras. Dermatol.**, v. 76, n. 6, p. 689-697, 2004.

DAVID, R.; CARDE, J.P. Coloration différentielle des inclusions lipidique et terpeniques des pseudophylles du Pin maritime au moyen du reactif Nadi. **Comptes Rendus Hebdomadaires des Séances de l' Academie des Sciences Paris**. v. 258, p.1338-1340, 1964. (Série D)

DE CARVALHO JR, P.M.; RODRIGUES, R.F.; SAWAYA, A.C.; MARQUES, M.O.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v.95, p. 297–301, 2004.

DEGANI, A.L.G.; CASS, Q.B.; VIEIRA, P.C. Cromatografia: um breve ensaio. **Química Nova na Escola**, n. 7, 1998.

DETERMINAÇÃO do resíduo sólido de vegetal fresco. Métodos de preparação de forma farmacêutica básica. In: FARMACOPEIA Homeopática Brasileira. Métodos gerais. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 1997. parte. I, p. X-1.

DE CARVALHO JR, P.M.; RODRIGUES, R.F.O.; SAWAYA, A.C.H.F.; MARQUES, M.O.M.; SHIMIZU, M.T. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Cordia verbenacea* D.C. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 95, p. 297-301, 2004.

DIEKEMA, D. J.; MESSER, S. A.; BOYKEN, L.; B. HOLLIS, R. J.; KROEGER, J.; TENDOLKAR, S.; PFALLER, M. A. In vitro activity of seven systemically active antifungal agents against a large global collection of rare *Candida* species as determined by CLSI broth Microdilution Methods. **Journal of Clinical Microbiology**, n.47, p.3170-3177, 2009.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 4. ed. São Paulo: Atheneu, 1988. pt. I, p. V.2.9., V.2.11., V.2.19., V.2.19.2., V.4.2.1., V.4.2.3., V.4.2.4., V.4.2.5.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 1996.

FARMACOPÉIA BRASILEIRA. 4 ed. São Paulo: Atheneu, 2000.

FARMACOPEIA BRASILEIRA. 5.ed. Brasília: Fiocruz, 2010.

FISCHER, D.B. Protein staining of ribboned epon sections for light microscopy. **Histochemie**, v. 16, p. 92-96, 1968.

GANTER, P.; JOLLÉS, G. **Histochimie normale et pathologique**. Paris: Gauthier, Villars. 1969-1970. v. 2.

GEISSMAN, T.A.; GRIFFIN, T.S. Sesquiterpene lactones: acid-catalyzed color reactions as an aid structure determination. **Phytochemistry**, v.10, p. 2475-2485, 1971.

GUEDES, R.C.M.; NOGUEIRA, N.G.P.; FUSCO-ALMEIDA, A.M.; SOUZA, C.R.F.; OLIVEIRA, W.P. Atividade Antimicrobiana de Extratos Brutos de *Petiveria alliacea* L. **Latin American Journal of Pharmacy**, v. 28, n. 4, p. 520-524, 2009.

HARBORNE, J. B. Phytochemical methods: a guide to modern techniques of plant analysis. 2nd ed. London: Chapman and Hill, 1998. 288 p.

HARDMAN, R.; SOFOWORA, E.A. Antimony trichloride as test reagents for steroids, especially diosgenin and yamogenin, in plant tissues. **Stain Technol**, v. 47, p. 205-208, 1972.

HAWSER, S.; ISLAM, K. Comparisons of the effects of fungicidal and fungistatic

antifungal agents on the morphogenetic transformation of *Candida albicans*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 43, p. 411-413, 1999.

HIGUCHI, C.T. ***Byrsonima* spp**: estudo anatômico e histoquímico foliar, atividade antimicobacteriana e citotoxicidade de extratos e seus derivados. Araraquara, 2007. f. Dissertação (Mestrado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Araraquara, 2007.

HUBINGER, S.Z.; SALGADO, H.R.N.; MOREIRA, R.R.D. Controles físico, físico-químico, químico e microbiológico dos frutos de *Dimorphandra mollis* Benth., Fabaceae. **Revista brasileira de farmacognosia**, v. 19, n. 3, p.690-696, 2009.

JENSEN, W.A. **Botanical histochemistry**: principles and practice. San Francisco: WH Freeman, 1962. 408 p.

JOHANSEN, D.A. **Plant microtechnique**. New York: McGraw-Hill, 1940. 523 p.

JORGE, L.I.F.; MARKAMAN, B.E.O.; GONZALEZ, E.; FERRO, V.O. Identificação de *Cordia verbenacea* DC. (erva baleeira) como fitoterápico. **Rev. Bras. Farm.** v. 79, n. 3, p. 69-71, 1998.

KRAUS, J.E.; ARDUIN, M. **Manual básico de métodos em morfologia vegetal**. Rio de Janeiro: EDUR, 1997. v. 1, 198 p.

LADEIRA, R.S. **Preparação do extrato seco de *Cordia verbenacea***. 2002. f. Trabalho de Conclusão de Curso (Especialização). Faculdade de Ciências da Saúde de São Paulo, Porto Alegre: Instituto Brasileiro de Estudos Homeopáticos, 2002.

LEWINSOHN, E.; DUDAI, N.; TADMOR, Y.; KATZIR I.; RAVID U.; PUTIEVSKY E.; JOEL, D.M. Histochemical localization of citral accumulation in lemongrass leaves (*Cymbopogon citrates* (DC.) Stapf., Poaceae). **Annals Botany**, v. 81, p. 35-39, 1998.

LINS, A.P.; ALVARENGA, M.A.; GOTTLIEB, O.R.; OLIVEIRA, F. Two flavonoids from *Cordia verbenacea*. **Revista Latino-Americana de Química**, v. 21, n. 82, 1990.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. **Plantas medicinais no Brasil**: nativas e exóticas. Nova Odessa – SP: Instituto Plantarum, 2002. 100p.

MACE, M.E.; HOWELL, C.R. Histochemistry and identification of condensed tannin precursor in roots of cotton seedlings. **Phytopathology**, v. 64, p.1297-1302, 1974.

MACHADO, F.C.; PORTELA, M.B.; CUNHA, A.C.; SOUZA, I.P.R.; SOARES, R.M.A.; CASTRO, G.F.B.A. Antifungal activity of chlorhexidine on *Candida* spp. Biofilm. **Revista de Odontologia da UNESP**, v. 39, n. 5, p. 271-275, 2010.

MARTINS, A.B.; SACRAMENTO, L.V.S. Análise microscópica e física para controle de qualidade primário de matéria prima vegetal pulverizada. In: CONGRESSO DE INICIAÇÃO CIENTÍFICA DA UNESP, 16, 2004, Ilha Solteira. **Anais...** Ilha Solteira: UNESP, 2004. (CD ROM)

MATIAS, E.F.F.; SANTOS, K.K.A.; ALMEIDA, T.S.; COSTA, J.G.M.; COUTINHO, H.D.M. Atividade antibacteriana *in vitro* de *Croton campetris* A., *Ocimum gratissimum*

L. e *Cordia verbenacea* DC. **Revista Brasileira de Biociências**. v. 8, n.3, p. 294-298, 2010.

MBAVENG, A.T.; KUETE, V.; NGAMENI, B.; BENG, V.P.; NGADJUI, B.T.; MEYER, J.J.M.; LALL, N. Antimicrobial activities of the methanol extract and compounds from the twigs of *Dorstenia mannii* (Moraceae). **Bio Med Central Complementary and Alternative Medicine**, v. 12, n. 83, 2012.

NETO, M.M.; COSTA, R.S.; REIS, M.A.; GARCIA, T.M.P.; FERRAZ, A.S.; SABER, L.T.S.; BATISTA, M.E.P.N.; MUGLIA, V.; FIGUEIREDO, J.F.C. Candidíase em pacientes transplantados renais. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, n. 6, p. 485-491, 1997.

O'BRIEN, J.; WILSON, I.; ORTON, T.; POGNAN, F. Investigation of the Alamar Blue (resazurin) fluorescent dye for the assessment of mammalian cell cytotoxicity. **European Journal of Biochemistry**, v. 267, n. 17, p. 5421-5426, 2000.

PASSOS, X.S.; SANTOS, S.C.; FERRI, P.H.; FERNANDES, O.F.L.; PAULA, T.F.; GARCIA, A.C.F.; SILVA, M.R.R. Atividade antifúngica de *Caryocar brasiliensis* (Caryocaraceae) sobre *Cryptococcus neoformans*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 6, p. 623-627, 2002.

PFALLEAR, M.A.; DIEKEMA, D.J. International fungal surveillance participant group. Twelve years of fluconazole in clinical practice: global trends in species distribution and fluconazole susceptibility of bloodstream isolates of *Candida*. **Clinical Microbiology and Infection**, v.10, n.1, p.11–23, 2004.

PINHO, L.; SOUZA, P.N.S.; SOBRINHO, E.M.; ALMEIDA, A.C.; MARTINS, E.R. Atividade antimicrobiana de extratos hidroalcoolicos das folhas de alecrim-pimenta, aroeira, barbatimão, erva-baleeira e do farelo da casca de pequi. **Ciência Rural**. 2011.

PINTO, J.E.B.P.; CARDOSO, M.G.; ARRIGONI-BLANK, M.F. Estabelecimento de cultura de células em suspensão e identificação de flavonoides em *Cordia verbenacea* DC. **Rev. Bras. Pl. Med.**, v.11, n. 11, p. 7-11, 2009.

RIOS, J.L.; RECIO, M.C. Medicinal plants and antimicrobial activity. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 100, p. 80–84, 2005.

RODRIGUES, F.F.G.; OLIVEIRA, L.G.S.; RODRIGUES, F.F.G.; SARAIVA, M.E.; ALMEIDA, S.C.X.; CABRAL, M.E.S.; CAMPOS, A.R.; COSTA, J.G.M. Composição química, atividade antibacteriana e antifúngica do óleo essencial de *Cordia verbenacea* DC. **Pharmacognosy**, v. 4, n. 3p. 161–165, 2012.

SANTOS, M.C.B.G.; PINHO, M.S. Estratégias tecnológicas em transformação: um estudo da indústria farmacêutica brasileira. **ENEGEP**, p.1-15, 2010.

SERTIÉ, J.A.A.; BASILE, A.C.; PANIZZA, S.; MATIDA, A.K.; ZELNIK, R. Pharmacological assay of *Cordia verbenacea*. Part 1. Anti-inflammatory activity and toxicity of the crude extracts of the leaves. **Planta Medica**. v.54, n.1, p.7-10, 1988.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P.; GOSMANN, G.; MELLO, J.C.P.; MENTZ, L.A.; PETROVICK, P.R.; **Farmacognosia : da planta ao medicamento**. 6. ed. Santa Catarina: Editora da UFSC, 2010.

SOBEL, J.D.; FARO, S.; FORCE, R.W. Vulvovaginal candidiasis: epidemiologic, diagnostic, and therapeutic considerations. **Am J Obstet Gynecol**, v. 178, p.203-211, 1998.

SVENDSEN, A.B.; VERPOORTE, R. **Chromatography of alkaloids**. New York: Elsevier Scientific Publishing, 1983. 276 p.

VEIGA-JÚNIOR, V. F.; PINTO, A. C.; MACIEL, M. A. M. Plantas medicinais: cura segura? **Química Nova**, v. 28, n. 3, p. 519-528. 2005.

VELDE, V.V.; LAVIE, D.; ZELNIK, R.; MATIDA, A.K. Cordialin A and B, two new triterpenes from *Cordia verbenacea* DC. **Journal of the Chemical Society Erkin Trans**, v. 1, p. 2697-2700, 1982

WAGNER, H.; BLADT, S.; RICKLÇ, V. **Plant drug analysis: athin layer chromatography atlas**. 2. ed. Berlin: Springer Verlag, 1996. 384p.

WHO. WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Quality control methods for medicinal plant materials**. Geneva, 2001